

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
1 avril 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/026311 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/506, A61P 31/12, 11/06, 29/00, 35/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002744

(22) Date de dépôt international :
17 septembre 2003 (17.09.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/11545 18 septembre 2002 (18.09.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : IN-
STITUT GUSTAVE ROUSSY (IGR) [FR/FR]; 39, rue
Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : ZITVO-
GEL, Laurence [FR/FR]; 17, rue du Nord, F-92160
Antony (FR). AUCLAIR, Christian [FR/FR]; 3, avenue
Boudon, F-75016 Paris (FR). TURSZ, Thomas [FR/FR];
34, rue Gazan, F-75014 Paris (FR).

(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker
et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

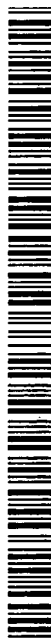
En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF SPECIFIC INHIBITORS OF TYROSINE KINASES FOR IMMUNOMODULATION

(54) Titre : UTILISATION D'INHIBITEURS SPECIFIQUES DE TYROSINE KINASES POUR L'IMMUNOMODULATION

(57) Abstract: The invention relates to the use of inhibitors of tyrosine kinases for immunomodulation, i.e. for regulation of the activity of immune cells in patients. The invention more particularly relates to the use of specific inhibitors of tyrosine kinases in the preparation of a composition for preventing or treating viral infections sensitive NK tumors, immune diseases and/or septic shock in mammals. Said inhibitors question are more particularly inhibitors of tyrosine kinases c-abl (bcr/abl), c-kit and /or tyrosine kinase associated with the PDGF receptor. The invention also relates to compositions comprising one such inhibitor, combined with other active agents, i.e. agents which can potentiate the inhibiting effect. The invention can be used in a preventative or curative manner, in vivo ou ex-vivo.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinases pour l'immunomodulation, notamment pour réguler l'activité de cellules immunitaires chez des patients. Elle concerne plus particulièrement l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinases pour la préparation d'une composition destinée à la prévention ou au traitement d'infections virales, de tumeurs NK sensibles, de maladies immunitaires et/ou du choc septique chez un mammifère. Les inhibiteurs concernées sont plus particulièrement des inhibiteurs des tyrosine kinases c-abl (bcr/abl), c-kit et /ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF. L'invention décrit également des compositions comprenant un tel inhibiteur, en combinaison avec d'autres agents actifs, notamment des agents capables de potentialiser l'effet de l'inhibiteur. L'invention est utilisable de manière préventive ou curative, in vivo ou ex-vivo.



WO 2004/026311 A2

UTILISATION D'INHIBITEURS SPECIFIQUES DE TYROSINE KINASES
POUR L'IMMUNOMODULATION.

5 L'invention concerne l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinases pour l'immunomodulation, notamment pour réguler l'activité de cellules immunitaires chez des patients. Elle concerne plus particulièrement l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinases pour la préparation d'une composition destinée à la prévention ou au traitement d'infections virales, de tumeurs NK sensibles,
10 de maladies immunitaires et/ou du choc septique chez un mammifère. Les inhibiteurs concernés sont plus particulièrement des inhibiteurs des tyrosine kinases c-abl (bcr/abl), c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF. L'invention décrit également des compositions comprenant un tel inhibiteur, en combinaison avec d'autres agents actifs, notamment des agents
15 capables de potentialiser l'effet de l'inhibiteur. L'invention est utilisable de manière préventive ou curative, in vivo ou ex vivo.

Les tyrosine kinases sont des enzymes clés du contrôle positif de la multiplication cellulaire. Fréquemment, des mutations de proto-oncogènes en
20 oncogènes sont dues justement à des mutations du domaine kinase rendant l'activité tyrosine kinase constitutive et non régulable. C'est notoirement le cas dans la Leucémie Myéloïde chronique (LMC), où la translocation (9;22) aboutit à l'expression d'une protéine de fusion bcr-abl qui possède une activité tyrosine kinase permanente. Il a été clairement démontré que cette activité tyrosine
25 kinase constitutive est le *primum movens* de la LMC.

Dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), tumeurs originaires de la cellule interstitielle de Cajal (CD34+, c-kit+, desmin-, S-100-), des mutations au niveau du proto-oncogène c-kit (21-88% mutations ponctuelles ou délétions au
30 niveau du domaine juxtamembranaire -exon 11>exon 9 ou 13-) sont également responsables de la pathogénie moléculaire (Hirota S, Science 279 (1998) 577,

Miettinen M, Human Pathol 30 (1999) 1213). Ces mutations entraînent l'activation constitutive de c-kit, indépendante du ligand SCF.

Compte tenu du rôle des tyrosine kinases dans le contrôle de la multiplication cellulaire, et de la mise en évidence de cancers liés à la présence d'une mutation dans ces protéines, il a été proposé d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de ces enzymes dans le traitement de ces cancers particuliers. Notamment, il a été proposé d'utiliser des inhibiteurs spécifiques des tyrosine kinases c-kit ou c-abl pour traiter les tumeurs présentant une mutation dans les gènes correspondants (CML, GIST).

L'inhibiteur le mieux caractérisé est le STI571 (Novartis), également désigné Gleevec, Glivec ou Imatinib Mesylate. Le STI571 (STI pour « *Signal Transduction Inhibitor* ») est un composé inhibiteur sélectif de certaines protéines tyrosine kinases : récepteur du PDGF, ABL tyrosine kinases (p210, p185, p190) et c-kit (CD117, récepteur du SCF) (Buchdunger E, J Pharmacol Exp Ther 295 (2000) 139 ; Druker BJ, Nat Med. 2 (1996) 561 ; Heinrich MC, Blood 96 (2000) 925). Ce composé agirait sur les mécanismes de la transduction du signal.

Le STI571 est indiqué dans le traitement de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) à chromosome Philadelphie positif en crise blastique, en phase accélérée ou en phase chronique, en particulier chez des patients intolérants, réfractaires ou en échec au traitement par interféron alfa. Dans la LMC, le STI571 agit en bloquant la fixation de l'ATP sur la tyrosine kinase bcr/abl, inhibant ainsi son activité de phosphorylation du substrat principal CRKL. Cette action inhibitrice repose sur une compétition avec l'ATP au niveau de la poche de liaison de la protéine avec ce dernier.

Les phases I et II du STI571 dans les GIST (van Oosterom, Lancet 358 (2001) 1421 ; Joensuu H, N Engl. J. Med. 344 (2001) 1052) ont aussi montré plus de 50% de réponses cliniques objectives, dont certaines spectaculaires dans leur

rapidité d'installation. Contrairement au modèle de la LMC, dans le GIST, on ne connaît pas le site d'action moléculaire du STI571.

5 Le STI 571 a également démontré *in vitro* une activité inhibitrice vis-à-vis de tyrosines kinases autres que celles des protéines de la famille abl, notamment vis-à-vis de celles de c-Kit et du PDGF. Kit est un récepteur de facteur de croissance dont un ligand est le « *Stem Cell Factor* » (SCF) ou facteur Steel, et possède un rôle capital dans la multiplication de la différenciation des précurseurs précoces hématopoïétiques.

10

La présente demande résulte de la mise en évidence de propriétés immuno-modulatrices particulièrement remarquables et inattendues des inhibiteurs de tyrosine kinases. La présente demande montre en particulier que, de manière surprenante, des inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinase, tels le STI571, sont
15 capables d'agir sur l'activité des cellules dendritiques, et de modifier leurs propriétés. L'invention montre notamment que de tels composés permettent de moduler l'activité des cellules dendritiques immatures pour induire l'activation de cellules NK, *in vitro* et *in vivo*. L'invention montre aussi que de tels composés sont également capables d'inhiber la maturation des cellules dendritiques
20 induite par le LPS et, de ce fait, de limiter la réponse inflammatoire. Ces résultats sont totalement inattendus dans la mesure où aucune activité immunomodulatrice pour de tels inhibiteurs n'avait été envisagée antérieurement. Cette activité est également très surprenante puisqu'elle est effective sur des cellules ne présentant pas nécessairement une mutation dans
25 un récepteur associé à une tyrosine kinase. Cette activité est également surprenante de par son amplitude, puisque, comme cela est illustré dans les exemples, l'utilisation *in vivo* de tels composés permet d'aboutir à une activation des cellules NK chez 30 à 56% des malades atteints de GIST.

30 La mise en évidence des propriétés immuno-modulatrices de ces inhibiteurs spécifiques ouvre de nouvelles applications thérapeutiques non envisagées jusqu'à présent pour ces composés, et permet également de potentialiser ou

optimiser leurs propriétés. En particulier, les nouvelles propriétés biologiques de ces inhibiteurs permettent, pour la première fois, d'envisager leur utilisation pour traiter de multiples cancers sensibles aux NK, des cancers devenus secondairement résistants aux STI571, de traiter des cancers qui ne comportent pas la mutation c-abl, c-kit ou PDGF-R, de traiter des maladies infectieuses ou de réduire l'inflammation. En montrant l'action des inhibiteurs sur les cellules dendritiques, l'invention permet également de potentialiser fortement l'effet thérapeutique de ces composés en les combinant par exemple à des facteurs de croissance des cellules dendritiques.

10

La présente invention offre donc de nouvelles approches efficaces dans le traitement de cancers, maladies infectieuses ou immunes, basées sur une modulation originale et efficace de la réponse immune.

- 15 Un premier objet de l'invention réside ainsi dans l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase pour moduler l'activité de cellules dendritiques in vivo, ex vivo ou in vitro, notamment dans l'utilisation d'un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF, pour la préparation d'une composition destinée à moduler l'activité des
- 20 cellules dendritiques chez un mammifère.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase pour stimuler l'activité de cellules NK in vivo, in vitro ou ex vivo.

- 25 Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase pour le traitement prophylactique ou curatif de tumeurs ou d'infections virales, notamment de tumeurs NK sensibles.

- Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase pour augmenter l'activité NK chez des patients atteints de
- 30 cancer ou d'infection virale.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase pour réduire la réponse inflammatoire, notamment chez des sujets atteints de pathologies inflammatoires chroniques ou de maladies autoimmunes.

5

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase pour favoriser la GVL lors de greffes allogéniques.

10 L'invention concerne également des méthodes de traitement prophylactique ou curatif de pathologies cancéreuses, infectieuses, immunes ou inflammatoires, comprenant l'administration à un patient (i) d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase, seul ou en association avec un ou plusieurs autres principes actifs, ou (ii) de cellules dendritiques (de préférence autologues) traitées avec un tel composé.

15

L'invention concerne aussi une méthode pour moduler l'activité de cellules dendritiques chez un patient, comprenant l'administration, audit patient, d'une quantité efficace d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase.

20 L'invention concerne aussi une méthode pour stimuler l'activité de cellules NK chez un patient, comprenant l'administration, audit patient, d'une quantité efficace d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase ou de cellules dendritiques traitées par un tel inhibiteur.

25 L'inhibiteur de tyrosine kinase peut être utilisé seul ou, de préférence, combiné à un agent potentialisant. A cet égard, l'invention concerne également une composition comprenant un inhibiteur spécifique de tyrosine kinases et un agent potentialisant, choisi de préférence parmi un facteur de croissance des cellules dendritiques et un facteur de (co-)stimulation des cellules NK.

30

Elle concerne également une composition comprenant des cellules dendritiques, notamment immatures, traitées par un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase.

Elle concerne également une association thérapeutique entre un inhibiteur spécifique de tyrosine kinases et un agent potentialisant, choisi de préférence parmi un facteur de croissance des cellules dendritiques et un facteur de (co-)stimulation des cellules NK, en vue d'une utilisation séparée, simultanée ou espacée dans le temps.

Elle concerne par ailleurs une trousse comprenant un inhibiteur spécifique de tyrosine kinases et un agent stimulant la production de cellules dendritiques.

10

L'invention peut être utilisée dans les domaines de l'immunologie, l'immunothérapie ou de la biotechnologie médicale. Comme indiqué ci-après, l'utilisation de ces inhibiteurs en tant qu'agents immuno-modulateurs est variée. Ils trouvent des applications à la fois *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, pour contrôler l'activité des cellules dendritiques ou des cellules NK, pour réguler la réponse immune ou inflammatoire dans différents contextes pathologiques. L'invention est utilisable chez tous les mammifères, en particulier chez l'être humain, même si un usage chez l'animal est également possible. Le terme « traitement » désigne le traitement préventif ou curatif.

20

Inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinase

La présente demande concerne donc l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinase comme immuno-modulateurs. Au sens de l'invention, on entend par inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinase des composés capables d'inhiber préférentiellement l'activité des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF.

L'inhibition peut être partielle ou totale. Il peut s'agir de composés capables d'inhiber l'activité de la forme mutée des tyrosines kinases identifiées ci-dessus, et notamment la forme mutée active de manière constitutive, ou bien d'inhiber la forme non mutée ou surexprimée dans des cellules « normales non

transformées » comme les cellules dendritiques. Les composés sont de préférence sans effet substantiel direct sur d'autres tyrosine kinases.

Les composés inhibiteurs préférés de l'invention sont des molécules chimiques de la famille des pyrimidines, tels que les composés décrits dans les demandes ou brevets n° WO01/64200, WO99/03854, EP 0564 409 et US 6,258,812. Il peut également s'agir des composés pyrido[2-3 α]-pyrimidine décrits par Wisniewski D. et al. (Cancer. Res. 62 (2002) 4244).

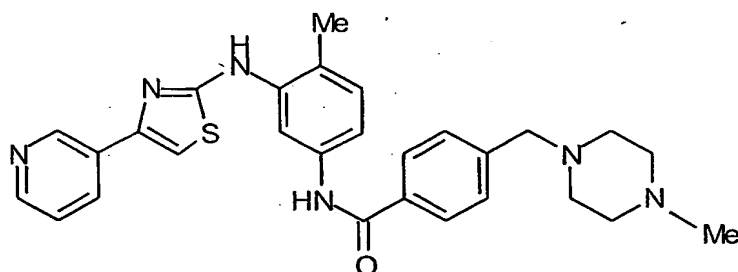
Un inhibiteur préféré est un composé de la famille des 2-phenylaminopyrimidines, tel que le composé STI571 ou tout dérivé ou analogue de celui-ci.

Le STI571 est un inhibiteur spécifique des protéines tyrosine kinases mentionnées ci-avant, sans effet substantiel sur le récepteur de l'EGF, FLT1 et FLT3. La demi-vie du STI571 est de 16 heures chez l'homme, et ce composé est métabolisé par le cytochrome P450 (CYP3A4, CYP2D6). Ce composé est globalement bien toléré par l'homme.

D'autres inhibiteurs spécifiques des tyrosine kinases peuvent être utilisés dans le cadre de l'invention, même si on préfère ceux ayant une activité sélective pour les tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou associée au récepteur du PDGF. De même, des inhibiteurs peuvent être identifiés ou sélectionnés in vitro ou en tests cellulaires, en mesurant la liaison ou l'activité de composés test sur la tyrosine kinase isolée ou une cellule la contenant.

Un autre exemple d'inhibiteur est le composé AB1003 ou tout dérivé (e.g., par substitution) de celui-ci, tels que décrits dans la demande n° US60/400064. La formule du composé AB1003 [2-(2-méthyl-5-amino)phényl-4-(3-pyridyl)-thiazole] est représentée ci-dessous :

5



10 Activation des Cellules NK – Production de cellules DAK (« DC-Activated Killer ») et effets thérapeutiques

Un objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase pour la préparation d'une composition destinée à activer les cellules NK d'un sujet. L'invention montre en effet que de tels
15 composés sont capables d'augmenter la fonction NK chez des patients, in vivo, conduisant à une action anti-tumorale ou anti-infectieuse puissante. L'invention montre que cette augmentation est liée à une modulation des cellules dendritiques, leur conférant la capacité d'activer les cellules NK.

20 Les cellules tueuses naturelles (« cellules NK ») sont une population de lymphocytes qui représentent une ligne de défense très précoce contre les virus et les cellules tumorales. Les cellules NK peuvent être caractérisées par la présence des marqueurs CD56 et CD16, et par l'absence du marqueur CD3. Les cellules NK ont notamment été impliquées dans l'immunité anti-tumorale
25 non spécifique d'antigènes, pour la prévention d'établissement de tumeurs primitives ou métastatiques chez l'hôte immunocompétent ou immunosupprimé. Les cellules NK semblent en particulier avoir un rôle clef contre les cellules tumorales ou les variants CMH classe I négatifs. Le rôle des cellules NK dans l'immunosurveillance anti-tumorale a été largement documenté, chez la souris
30 (Diefenbach, Nature 413 (2001) 165) comme chez l'homme (A. Velardi, Science 2002). Le rôle des cellules NK dans la prévention des infections virales est également très documenté, notamment pour les virus du groupe des Herpes

Viridae (C. Biron, N.Engl.J.Med. 320 (1989) 1731 ; Welsch et al., J. Exp. Med. 2001).

En raison de leurs propriétés cytotoxiques non-spécifiques d'antigène et de leur
5 efficacité, les cellules NK constituent donc une population de cellules effectrices
particulièrement intéressante pour le développement d'approches
d'immunothérapie adoptive des cancers ou des maladies infectieuses. A cet
égard, dans certaines indications comme les patients porteurs de lymphomes
malins intensifiés, l'administration de cellules NK associées à de faibles doses
10 d'IL-2 a donné des résultats prometteurs en situation adjuvante. Les cellules NK
ont également été utilisées pour le traitement expérimental de différents types
de tumeurs et certaines études cliniques ont été initiées (Kuppen et al. Int. J.
Cancer. 56 (1994) 574 ; Lister et al., Clin. Cancer Res. 1 (1995) 607 ;
Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 316 (1987) 889). Il a également été montré
15 que les cellules NK favorisent la GVL dans les greffes de moelle allogénique. En
outre, ces cellules peuvent également être utilisées *in vitro* pour la lyse non
spécifique de cellules n'exprimant pas de molécules du CMH de classe-I et, plus
généralement, de toute cellule sensible aux cellules NK.

20 La possibilité d'activer *in vivo* les cellules NK d'un patient offre donc de multiples
avantages et applications thérapeutiques.

Les méthodologies d'activation des cellules NK décrites dans l'art antérieur sont
essentiellement dépendantes de l'utilisation de cytokines. Les cellules NK sont
25 activables par des cytokines *in vitro* ou en administration systémique *in vivo* (IL-
2, IL-12, IFN type I ou II, IL-15 en association ou non avec IL-1b, IL-18, IL-21 ou
des chemokines). Cependant, le rôle physiopathologique de ces cytokines pour
l'activation NK *in vivo* n'a jamais été démontré. De plus, l'application clinique
des cytokines est limitée, notamment en raison des coûts de préparation de ces
30 dernières, du caractère toxique de nombre d'entre elles, qui ne peuvent être
utilisées dans des applications *in vivo*, ou encore du caractère non spécifique de
nombreuses cytokines, dont l'emploi *in vivo* risque de s'accompagner de

nombreux effets indésirables. En outre, la fonction « natural killing » étant souvent altérée chez les patients porteurs de tumeurs, la possibilité de prélever ces cellules en vue de leur activation *ex vivo* peut être considérablement réduite.

5

Les inventeurs ont précédemment démontré que les cellules dendritiques (CD) étaient des cellules électivement capables d'activer les cellules NK *in vitro* et *in vivo*, conduisant à des effets anti-tumoraux (WO99/45102, Fernandez et al. Eur. Cyt. Net. 13 (2002) 17-27 ; Zitvogel L . JEM 195 (2002) F9-14).

10

Les inventeurs ont maintenant découvert que, de manière surprenante, les inhibiteurs spécifiques de Tyrosine Kinases, tels le STI571, induisent *in vivo* ou *in vitro*, une modification phénotypique des cellules dendritiques qui leur confère le pouvoir d'activer des cellules NK. Dans ce cadre, les inventeurs ont
15 notamment mis en évidence que l'administration à un mammifère d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase induit une augmentation très prononcée de la fonction et de l'activité des cellules NK. Ils ont par ailleurs observé que des inhibiteurs de tyrosine kinases, de type STI571, sont capables d'activer les fonctions NK chez des patients porteurs de GIST. Ainsi, chez des patients GIST
20 traités par le STI571, les cellules NK sont activées chez 30 à 56% des patients et ces données biologiques d'activation des NK semblent corrélér avec les réponses cliniques obtenues sous STI571 (avec notamment, aucune résistance primaire au STI571 chez les répondeurs biologiques). Ces résultats démontrent donc, *in vivo*, chez l'homme, que des inhibiteurs de tyrosine kinases, tels que le
25 STI571, présentent des activités immunomodulatrices en plus de leurs fonctions inhibitrices des activités tyrosine kinase déjà décrites.

Ces résultats permettent donc d'élargir les applications thérapeutiques de ces molécules et d'optimiser leurs effets.

30

La présente invention concerne ainsi l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase pour la préparation d'une composition destinée à augmenter

l'activité NK chez des patients atteints de cancer ou d'infection (virale, bactérienne ou parasitaire).

5 Un objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou associée au récepteur du PDGF pour la préparation d'une composition destinée à la prévention ou au traitement des infections, notamment virales.

10 Un autre objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou associée au récepteur du PDGF pour la préparation d'une composition destinée à la prévention ou au traitement des tumeurs NK sensibles non liées à une mutation constitutive dans une tyrosine kinase, ou résistantes au STI571.

15 Elle concerne également l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase pour la préparation d'une composition destinée à induire chez un mammifère une modification phénotypique des cellules dendritiques et permettre ou augmenter l'activation des cellules NK.

20 Elle concerne par ailleurs une méthode pour induire une modification phénotypique des cellules dendritiques et/ou pour activer les cellules NK, comprenant la mise en contact *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* de cellules dendritiques, seules ou co-cultivées avec des cellules NK, avec un inhibiteur de tyrosine kinase c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou associée au récepteur du PDGF.

25

L'invention concerne également une méthode de traitement préventif ou curatif d'un patient atteint d'un cancer ou d'une infection virale, comprenant l'administration d'une quantité d'inhibiteur spécifique de tyrosine kinase efficace pour activer la fonction NK chez le patient.

30

L'invention concerne par ailleurs une méthode pour activer les cellules NK chez un sujet, comprenant l'administration au sujet d'un inhibiteur de tyrosine kinases

c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF. Le sujet est de préférence un être humain mais il peut également s'agir d'un animal.

- 5 L'invention peut être utilisée également pour augmenter la survie de populations lymphocytaires NK, *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, ainsi que pour augmenter, le cas échéant, la prolifération de sous-population(s) lymphocytaire(s) NK.

Pour la mise en œuvre de l'invention, l'inhibiteur spécifique de tyrosine kinase
10 peut être utilisé seul. Néanmoins, dans une variante préférée et particulièrement efficace, l'inhibiteur est utilisé de façon combinée à un autre agent actif. Cet agent actif peut être de natures diverses, mais il s'agit préférentiellement d'un agent potentialisant l'action de l'inhibiteur, comme notamment un facteur de croissance des cellules dendritiques ou un facteur de (co-)stimulation des
15 cellules NK. En effet, l'invention montre que des inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinase peuvent permettre de stimuler *in vivo* la fonction NK chez des sujets, et que cette stimulation implique une modification phénotypique des cellules dendritiques. En combinant plusieurs agents actifs sur la production, sur la modification des cellules dendritiques et/ou sur l'activation des NK, un effet
20 biologique plus puissant peut donc être obtenu. En particulier, en combinant un facteur de croissance des cellules dendritiques et un inhibiteur selon l'invention, il est possible de produire une stimulation des fonctions NK suffisante pour obtenir un effet thérapeutique, même vis-à-vis de cellules pathologiques résistantes à l'action de l'inhibiteur seul.

25

Dans une variante préférée de l'invention, on utilise donc un inhibiteur tel que défini ci-dessus en combinaison avec un agent potentialisant. Le terme « combinaison » indique que les deux agents peuvent être utilisés de manière
simultanée ou espacée dans le temps, dans la mesure où leurs effets
30 biologiques sont combinés *in vivo*. Les agents peuvent donc être conditionnés simultanément ou de manière séparée, et administrés de manière concomitante ou décalée dans le temps.

Dans un premier mode de réalisation, l'agent potentialisant est capable d'amplifier les cellules dendritiques, c'est-à-dire d'augmenter leur différenciation, leur croissance ou leur activité. Il s'agit préférentiellement d'un facteur de croissance des cellules dendritiques, avantageusement choisi parmi le
5 Flt3Ligand (« Flt3L ») décrit par Lyman S.D. et al. (Blood 83 (1994) 2795-2801) et par Maraskovsky E. et al. (J. Exp. Med. 184 (1996) 1953-1962), le GM-CSF, l'interleukine-4, l'interleukine-13 et leurs dérivés ou analogues. Il peut s'agir notamment de la progénipoiétine (ProGP4, molécule de fusion entre le G-CSF et le Flt3L), d'une fusion GM-CSF/IL-4, etc. Cet agent peut être utilisé de façon
10 simultanée ou décalée dans le temps par rapport à l'inhibiteur des tyrosines kinases.

Dans un autre mode de réalisation, l'agent potentialisant est un facteur de co-stimulation des cellules NK, et notamment toute lymphokine ou cytokine susceptible d'activer ou de favoriser l'activation des cellules NK. On peut citer
15 par exemple l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15, l'interféron de type I, etc.

Dans un mode de réalisation particulier, on utilise un inhibiteur tel que défini ci-dessus en combinaison avec un facteur de croissance des cellules dendritiques et/ou un facteur de co-stimulation des cellules NK. Une combinaison
20 particulièrement préférée comprend l'inhibiteur et le Flt3L (ou un variant ou analogue de celui-ci).

A cet égard, un autre objet de l'invention réside également dans une composition comprenant un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase tel que
25 défini ci-dessus et un agent potentialisant, choisi de préférence parmi un facteur de croissance des cellules dendritiques et un facteur de co-stimulation des cellules NK. L'agent potentialisant est choisi à titre spécifique parmi les cytokines ou lymphokines activant les cellules NK ou parmi le Flt 3L, le GM-
30 CSF, l'IL-4, l'IL-13 et leurs dérivés ou analogues (ProGP4, GM/IL-4).

Les compositions selon l'invention peuvent naturellement comprendre en outre tout véhicule ou excipient acceptable sur le plan pharmaceutique, tel que des solutés isotoniques, tamponnés des solutions salines, agents stabilisants, etc.

- 5 Les applications des compositions et méthodes de l'invention sont nombreuses, de par le spectre d'action large des cellules NK. Elles incluent préférentiellement le traitement prophylactique ou curatif de différentes pathologies telles que les cancers ou les maladies infectieuses, notamment d'origine virale ou résultant d'autres pathogènes, et les immunodéficiences congénitales NK ou apparentées
10 (déficits immunitaires conduisant à une mutation dans le gène IFN γ -R, IL-12R...).

- Pour les applications dans le domaine du traitement des cancers, les compositions ou méthodes selon l'invention sont en particulier utilisables pour
15 retarder ou supprimer la croissance de tumeurs, induire une régression de la taille des tumeurs, ralentir ou prévenir la formation de métastases, etc., notamment des tumeurs exprimant faiblement des molécules de classe I du CMH ou possédant des ligands pour des récepteurs activateurs de NK ou d'autres cellules pathologiques. Elles permettent également de prévenir
20 l'établissement de tumeurs primitives ou métastatiques chez un mammifère immunocompétent ou immunosupprimé pour les fonctions lymphocytaires T.

- L'invention peut être utilisée pour prévenir ou traiter toute tumeur NK sensible, notamment celles choisies parmi les carcinomes, les mélanomes, les leucémies,
25 les lymphomes et les sarcomes. L'invention est particulièrement adaptée au traitement préventif ou curatif des mélanomes, du cancer du rein, des sarcomes du tube digestif, de la leucémie myéloïde chronique (LMC) et des neuroblastomes.

- 30 Il s'agit plus particulièrement du traitement préventif de cancers ne présentant pas de mutation dans une tyrosine kinase, ou présentant une mutation non constitutive, ou de tumeurs résistantes in vitro au STI571. Dans le cas de

tumeurs NK sensibles présentant une mutation dans une tyrosine kinase, l'invention permet d'améliorer l'efficacité thérapeutique en utilisant une thérapie de combinaison avec un agent potentialisant, tel que mentionné ci-avant.

- 5 A cet égard, l'invention concerne spécifiquement l'utilisation d'un inhibiteur de tyrosine kinase tel que défini ci-avant, en combinaison avec un agent potentialisant, pour la préparation d'une composition destinée au traitement prophylactique ou curatif de la LMC ou du GIST. Elle concerne également une méthode de traitement correspondante.

10

L'invention concerne également l'utilisation d'un inhibiteur de tyrosine kinase tel que défini ci-avant, en combinaison avec un agent potentialisant, pour la préparation d'une composition destinée au traitement prophylactique ou curatif d'une tumeur résistante au STI571. Elle concerne également une méthode de

- 15 traitement correspondante.

Dans le domaine des pathologies infectieuses, l'invention peut être utilisée pour le traitement prophylactique ou curatif en particulier une infection virale causée par un virus du groupe des *Herpes Viridae* (l'Herpes virus type 1 ou 2, le virus d'Epstein-Barr, le cytomegalovirus, le Kaposi sarcoma-virus, HSV-6, etc.), le

20 VIH, le Vaccinia virus, le MVM, l'ECMV ou le Papilloma Virus. Elle peut également être utilisée pour traiter des infections microbiennes ou parasitaires.

L'invention peut également être mise en œuvre en utilisant une population de

25 cellules dendritiques traitées ex vivo par un inhibiteur de tyrosine kinase tel que défini ci-avant. L'injection de cellules dendritiques ainsi traitées, de préférence autologues, permet également d'induire une activation de la fonction NK d'un sujet.

- 30 Dans ce contexte, l'invention concerne également une composition comprenant des cellules dendritiques traitées par un inhibiteur des tyrosines kinases telles que mentionnées précédemment. Elle concerne également une composition

comprenant un inhibiteur de tyrosine kinase tel que défini précédemment et des cellules dendritiques et/ou des cellules NK. Selon un aspect particulier de l'invention, la composition comprend un inhibiteur de tyrosine kinase tel que défini précédemment et des cellules dendritiques.

5

Selon un autre aspect, la composition comprend un inhibiteur de tyrosine kinase tel que défini précédemment, des cellules dendritiques et des cellules NK.

10

Elle concerne également un procédé de préparation ou de traitement in vitro ou ex vivo de cellules dendritiques, comprenant la mise en contact de cellules dendritiques (ou de leurs précurseurs) en présence d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase. Les cellules obtenues peuvent être collectées et conditionnées en vue d'une utilisation immédiate ou future.

15

Les cellules dendritiques sont typiquement traitées par incubation en présence de l'inhibiteur, par exemple en présence de STI571, à raison de 10^{-6} à 10^{-8} molaire environ. On préfère utiliser des cellules dendritiques non matures. De manière préférée, des cellules dendritiques humaines CD34+ sont mises en présence de SCF, Flt3L, GM-CSF et $TNF\alpha$ pendant 7 à 15 jours environ (de préférence 12-jours), puis en présence de STI571 pendant 12 à 48 heures environ (de préférence 24h environ). Il est entendu que les conditions précises peuvent être adaptées par l'homme du métier. Les cellules ainsi obtenues présentent la capacité d'activer les cellules NK, et peuvent être conditionnées en vue de leur utilisation thérapeutique, ou utilisées pour activer des cellules NK

25

in vitro ou ex vivo, notamment par co-culture. Dans ce contexte, une activation optimale des cellules NK est observée par exemple après co-culture pendant une période comprise entre 20 à 48 heures environ. Le ratio de co-culture est idéalement d'une cellule dendritique pour 25 à 125 cellules NK environ.

30

Pour une utilisation in vitro ou ex vivo, l'invention peut être mise en œuvre dans tout dispositif approprié à la culture cellulaire, de préférence en conditions stériles. Il peut s'agir notamment de plaques, boîtes de culture, flasques, fioles,

poches, etc. La culture ou la co-culture est par ailleurs réalisée dans tout milieu adapté à la culture des cellules dendritiques et/ou des cellules NK. Il peut s'agir plus généralement de milieux de culture disponibles dans le commerce pour la culture de cellules de mammifères, tels que par exemple le milieu RPMI, le milieu DMEM, le milieu IMDM ou des milieux GBEA (AIMV, X-VIVO), etc.

Dans une variante particulière, l'activation des cellules NK est réalisée par coculture *in vitro* ou *ex vivo* de cellules dendritiques immatures avec des cellules NK, en présence d'un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, l'activation des cellules NK est réalisée par traitement *in vitro* ou *ex vivo* de cellules dendritiques immatures en présence d'un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, de c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF, puis co-culture des cellules dendritiques ainsi obtenues avec des cellules NK.

Dans un autre mode de l'invention, l'activation des cellules NK est réalisée par traitement *in vitro* ou *ex vivo* de cellules dendritiques immatures en présence d'un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, de c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF, puis administration des cellules dendritiques ainsi obtenues à un sujet.

Lorsque les cellules NK ou les cellules dendritiques ont ainsi été activées, il est possible soit de séparer les cellules NK des cellules dendritiques, soit de récolter directement la co-culture cellules NK/CD.

Le terme « activation » des cellules NK au sens de l'invention désigne plus particulièrement la régulation positive précoce du CD69, surtout sur la population CD56^{bright} des NK (celle qui s'expand chez les patients porteurs de GIST traités par STI571), l'augmentation de la production d'IFN γ et/ou de l'activité cytotoxique des cellules NK. Ces trois paramètres peuvent être

aisément mesurés selon les techniques connues de l'homme du métier. Le terme cellules NK « activées » désigne au sens de l'invention des cellules NK présentant au moins une des propriétés mentionnées ci-dessus. Il est aussi possible de détecter une activation NK par la capacité de ces cellules à libérer
5 de façon prolongée de forts taux d'IFN γ en présence de " CD immatures " et, éventuellement, en présence de LPS.

Dans les compositions selon l'invention qui comprennent des cellules dendritiques et/ou des cellules NK, les populations cellulaires sont
10 préférentiellement autologues, c'est-à-dire issues d'un même organisme. Elles peuvent également être constituées de cellules allogéniques. En outre, il peut également s'agir de cellules dendritiques sensibilisées à un ou plusieurs antigènes ou au contraire de cellules « naïves ». Ces compositions sont avantageusement constituées de populations cellulaires isolées, c'est-à-dire que
15 chacune des populations cellulaires est composée au moins de 10%, de préférence au moins 30%, notamment au moins 50% du type cellulaire correspondant (NK ou dendritique). Ces compositions peuvent être conditionnées dans tout dispositif adapté tel que poches, fioles, ampoules, seringues, flacons, etc., et peuvent être conservées (au froid) ou utilisées
20 extemporanément, comme décrit plus loin. Avantageusement, ces compositions comprennent de 10^4 à 10^9 cellules dendritiques traitées, de préférence de 10^5 à 10^8 environ.

L'administration de l'inhibiteur ou des cellules (dendritiques ou NK) peut être
25 réalisée par toute technique et toute voie connue, et notamment par injection ou prise orale. Il peut s'agir par exemple d'une injection sous cutanée, systémique (intra-veineuse, intra-artérielle, intra-péritonéale) ou intra-musculaire. Lorsque cela est possible, l'inhibiteur est avantageusement administré par voie orale. L'injection est de préférence une injection locale ou régionale, notamment une
30 injection au site ou proche du site à traiter, notamment proche d'une tumeur. Les injections sont généralement réalisées sur la base de doses de cellules pouvant aller de 10^4 à 10^9 cellules dendritiques, de préférence comprises entre

10⁵ et 10⁷ inclus. Il est possible d'effectuer le transfert passif de cellules dendritiques par des administrations répétées, par exemple 1 à 2 administrations par semaine pendant plusieurs mois. Le composé inhibiteur peut être administré à des doses variées, comprises par exemple entre 200 et 800 mg per os/jour, de préférence entre 400 mg et 600 mg per os/jour, notamment en cas d'association avec un agent potentialisant (par exemple Flt3L sc 10-50 µg/kg pendant 10-20 jours). L'utilisation de l'inhibiteur in vitro ou ex vivo sur les cellules dendritiques avant transfert passif est réalisée préférentiellement à la dose de 10⁻⁶M ou 10⁻⁸M. Des administrations répétées sont bien entendu possibles. En outre, le protocole d'administration peut être adapté par l'homme du métier selon les situations (préventif, curatif, tumeurs isolées, métastases, infection importante ou localisée, etc.).

ACTION ANTI-INFLAMMATOIRE

15

Les demandeurs ont également découvert que des inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinase, tels que définis ci-avant, permettaient de bloquer la maturation des cellules dendritiques induite par un agent microbien tel que le LPS ou par un signal « Toll-like 4 ».

20

Cette propriété immuno-modulatrice des inhibiteurs permet d'envisager une modulation négative de la réponse inflammatoire ou de la réponse immune dans différents contextes pathologiques. En effet, la maturation des cellules dendritiques participe activement au développement de la réaction inflammatoire, et la possibilité de contrôler cette propriété offre donc de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement ou le contrôle de l'inflammation.

L'invention concerne donc une méthode pour prévenir ou inhiber la maturation des cellules dendritiques, notamment celle induite par une toxine telle le LPS, comprenant la mise en contact *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* des cellules

dendritiques avec un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, de c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF.

5 L'invention concerne également l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase tel que défini ci-avant pour le traitement préventif ou curatif des maladies immunitaires et/ou inflammatoires chez un mammifère.

10 L'invention concerne également l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase tel que défini ci-avant pour la préparation d'une composition destinée au traitement de pathologies inflammatoires, notamment chroniques, telles que l'athérosclérose, la maladie de Crohn, l'asthme (chronique), la polyarthrite rhumatoïde, la dermatite (chronique), le choc septique ou endotoxinique, etc. Dans ce contexte, le terme traitement inclut également une réduction de la
15 amélioration de la qualité de vie des patients.

L'invention concerne également l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase tel que défini ci-avant pour la préparation d'une composition destinée au traitement de pathologies auto-immunes.

20

L'invention concerne également l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase tel que défini ci-avant pour la préparation d'une composition destinée à la greffe allogénique. L'invention est particulièrement adaptée à l'amélioration des greffes de moelle allogénique. En effet, en stimulant l'activité NK, l'invention
25 permet d'améliorer l'activité GVL (« graft versus Leukemia »), et donc le bénéfice thérapeutique. Mais de plus, en réduisant la maturation des cellules dendritiques et donc, potentiellement, l'activation de lymphocytes T cytotoxiques alloréactifs, l'inhibiteur permet en outre de réduire la GVHD (« Graft Versus Host Disease ») et ainsi d'améliorer la sécurité du traitement. L'invention peut donc
30 être utilisée avantageusement pour traiter un hôte recevant un greffon de moelle allogénique, HLA non compatible.

L'invention peut également être utilisée pour prévenir ou traiter des maladies immunitaires congénitales, telles qu'un déficit en récepteur à l'IL-12, un déficit en récepteur à l'IFN γ , un déficit en chaîne gamma (IL-2R γ) commune des récepteurs aux cytokines (syndrome SCID).

5

Pour ces différentes applications, les doses administrées et les modes d'administration décrits précédemment sont directement applicables.

10 D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs. Le contenu de toutes les références citées dans la description et dans les exemples, y compris les articles, brevets et demandes de brevets, est incorporé entièrement à la présente par référence.

15

LEGENDE DES FIGURES

Tableau 1 : Corrélation biologique entre STI571 et l'activation des NK.

20 Une cohorte de patients pris en charge à l'institut Gustave Roussy a été étudiée pour le traitement d'un GIST. Les NK des patients ont été purifiées par sélection négative à partir du sang périphérique. Les fonctions des cellules NK (sécrétion d'interféron gamma et cytotoxicité) ont été analysées après culture avec des cellules dendritiques allogéniques. Dans 14 cas, les prélèvements sont effectués avant l'introduction du STI 571 ; dans 31 cas, les prélèvements sont
25 effectués pendant le traitement par STI 571. Une cohorte de 17 volontaires sains est étudiée selon les mêmes modalités.

Les fonctions cytotoxiques sont rapportées en pourcentage de lyse spécifique d'une cible sensible à la lyse NK (K562). Les résultats sont rapportés sous forme d'une moyenne pour chaque groupe étudié.

30 L'analyse des données est réalisée en utilisant des tests exacts de Fisher qui permettent de mettre en évidence les différences statistiquement significatives entre les groupes.

Tableau 2 : Corrélation entre effets biologiques et cliniques du STI571.

Les cellules NK activées par des cellules dendritiques matures (présence de LPS) ont la capacité de sécréter de l'interféron gamma. Cette production d'interféron gamma a été définie comme significative si l'on pouvait mesurer plus de 100 pg/mL dans les surnageants des cocultures. Les patients répondant à ce critère sont définis comme répondeurs biologiques. Une corrélation est établie entre ces patients et l'efficacité clinique du STI 571. La distribution des patients dont la maladie progresse sous STI 571 est étudiée en fonction de la réponse biologique.

Aucun patient identifié comme répondeur biologique ne présente une maladie progressive sous STI 571, alors que 5 des 16 patients non répondeurs biologiquement, progressent cliniquement ($p=0,042$;Fisher exact test).

Figure 1 : Suivi longitudinal de sept patients GIST sous STI571. Acquisition des fonctions NK.

Concernant 7 patients, des prélèvements et des mesures de la production d'interféron gamma sont disponibles. La figure 1 rapporte l'étude des fonctions NK avant et pendant le traitement par STI 571. Pour deux patients, une nette augmentation des cellules NK CD56bright (panel A) a pu être mise en évidence. Pour les sept patients suivis, les sécrétions d'interféron gamma sont augmentées lors de l'exposition au STI 571 (panel B).

Figure 2. Les cellules dendritiques incubées en présence de STI 571 sont capables d'activer les cellules NK.

Des cellules dendritiques humaines sont générées à partir de cellules souches hématopoïétiques, en présence de GM-CSF et de $TNF\alpha$, pendant 12 jours. Ces cellules dendritiques sont ensuite incubées avec du STI 571 pendant 24 heures. Deux expériences représentatives menées sur deux prélèvements différents (A

et B) sont rapportées. Les fonctions cytotoxiques NK sont étudiées par des tests de lyse utilisant des cibles marquées au chrome 51 et sensibles à la lyse NK (K562). Dans les deux cas, le STI 571 confère aux cellules dendritiques la capacité à activer les cellules NK.

5

Figure 3 : Les cellules dendritiques incubées en présence de STI571 sont capables d'activer les cellules NK.

Le STI 571 confère aux cellules dendritiques la capacité d'activer les cellules NK. Des cellules dendritiques d'origine murine, dérivées de moelle osseuse ou de rate sont pré-incubées avec du STI 571 à des doses croissantes puis cultivées avec des cellules NK. L'utilisation du STI 571 permet d'augmenter la sécrétion d'interféron gamma par les NK cultivés en présence de cellules dendritiques. De plus, il existe un effet dose entre les doses de STI 571 utilisées et l'effet biologique observé. L'expérience précédente est renouvelée en présence d'un inhibiteur de phosphorylation non spécifique (AG 957) et du STI 571. Cette expérience révèle que les résultats précédents sont spécifiques du STI 571.

Figure 4. L'analogue du STI, AB1003, augmente la capacité des cellules dendritiques à activer les cellules NK.

Les expériences précédentes sont reproduites en utilisant un analogue synthétique du STI 571, AB1003. Cette molécule confère également aux cellules dendritiques une fonction activatrice des cellules NK.

Figure 5 : Activation in vivo de NK par injection de cellules dendritiques incubées en présence de STI571.

Des cellules dendritiques murines sont pré-incubées avec du STI571 puis injectées, par voie sous cutanée, dans les membres inférieurs des souris. Les ganglions drainant sont recueillis et les fonctions des cellules NK analysées

après purification. L'utilisation de cellules dendritiques pré-incubées avec du STI 571 permet l'activation in vivo des NK dans le ganglion drainant comme en atteste la présence de CD69 sur la membrane des NK étudiées.

5 **Figure 6 : Activation in vivo de NK par injection de STI571 et d'un facteur de croissance des cellules dendritiques.**

Des souris Nude sont traitées pendant 10 jours par des injections intra-péritonéales de Flt3L. Ceci permet le recrutement et la différenciation de
10 précurseurs dendritiques. Le STI 571 est administré par gavage (per os), du J8 au J12. Les rates et les foies des souris sont ensuite prélevés pour purification des cellules NK. Les tests fonctionnels réalisés montrent une activation des cellules NK dans le groupe traité par l'association Flt3L+STI, au contraire des groupes contrôles (souris traitées par PBS IP, IL2 IP, PBS IP+ gavages de STI
15 571, Flt3-L IP+ gavages de PBS). Les panels A et B présentent l'analyse par cytométrie en flux de la présence du CD69 (marqueur membranaire d'activation) à la surface des cellules NK (DX5+), dans la rate et le foie des souris. Les panels C et D présentent les capacités de ces cellules NK, purifiées à partir des rates des souris de chaque groupe, à sécréter de l'interféron gamma après une
20 phase de culture avec des cellules dendritiques.

Le panel E représente l'étude des fonctions cytotoxiques des cellules NK de ces mêmes groupes, contre une cible NK sensible (YAC1) et selon deux ratios effecteur/cible (200/1 et 50/1).

25 **Figure 7 : Le STI571 bloque la maturation des DC par le LPS (Fig. 7A) et prévient le choc endotoxinique in vivo (Fig. 7B).**

Des cellules dendritiques sont générées à partir de moelle osseuse de souris C57BL6. Ces cellules dendritiques d'origine médullaire sont ensuite testées pour
30 leur capacité à induire une prolifération des lymphocytes allogéniques (panel A). Les cellules dendritiques cultivées en GM-CSF et IL4 (BM-DC), activées par du LPS (BM-DC+LPS) ou par du STI 571 (BM-DC STI) ou par un inhibiteur non

spécifique de phosphorylation (BM-DC AG), sont cultivées en présence de lymphocytes allogéniques pendant 5 jours. La prolifération des lymphocytes est évaluée par leur capacité à intégrer de la thymidine tritiée.

- 5 Le STI ne stimule pas la prolifération des lymphocytes allogéniques. Son effet immunomodulateur s'avère spécifique de la population lymphocytaire NK. Cette capacité d'inhibition des signaux inflammatoires comme le LPS est également testée dans le modèle du choc endotoxinique. Des souris C57BL6 sont traitées par ingestion per os de STI 571 matin et soir (150mg/kg). Les groupes contrôles sont traités de la même manière, par ingestion de PBS. Au
- 10 décours de 24 heures de traitement, on administre aux souris 1 mg de LPS par voie intrapéritonéale. Les gavages des souris avec du STI 571 ou du PBS sont poursuivis 48 heures.

Figure 8 : Le STI571 empêche la croissance in vivo de tumeurs résistantes aux effets anti-prolifératifs du STI571 in vitro.

15

(A). *Modèles de tumeurs de souris résistantes au STI571 in vitro.*

- Les cellules AK7, B16F10, RMA-S, MCA 102 ou BAF3p210 (qui sont porteuses de la translocation bcr/abl) ont été incubées pendant 24 heures avec les doses indiquées de STI571. Le nombre absolu de cellules survivantes a été déterminé
- 20 à l'aide d'un test d'exclusion au bleu trypan. L'absence d'effet anti-prolifératif du STI571 sur l'ensemble des tumeurs à l'exception des cellules BAF3p210 a été confirmé dans deux expérimentations indépendantes. Les indices de prolifération sont apparents. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les
- 25 indexes de prolifération (* $p < 0.05$).

(B). *Le STI571 inhibe, in vivo, la croissance de AK7 et MCA102.*

- 3×10^6 cellules de tumeur AK7 et 5×10^5 cellules de tumeur MCA102 ont été inoculées en sous-cutané dans le flanc abdominal, au jour 0. L'apport oral en STI571 (150 mg/kg) ou PBS (200 μ l) a été réalisé du jour 20 au jour 27 et du
- 30 jour 3 au jour 10 respectivement. Les résultats d'une expérience impliquant 7-9 souris par groupe apparaissent sur cette figure. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les cinétiques de croissance (* $p < 0.05$)).

(C). Les effets anti-métastatiques du STI571 à l'encontre du B16F10 sont médiés par les cellules NK.

Des anticorps neutralisants anti-NK1.1 (300 µg d'Acm PK136 par souris) ou du sérum normal de souris (SNS) a été administré en intra-péritonéal au jour -4, -2, 0 et au jour +4 à des souris C57BL/6. 5×10⁵ cellules de tumeur B16F10 ont été injectées dans la veine de la queue au jour 0. L'apport oral de STI571 (150 mg/kg) ou PBS (200 µl) a été réalisé du jour +5 au jour +11 et les souris ont été sacrifiées pour procéder à l'énumération des métastases du poumon au jour +11. Les résultats d'une expérience impliquant 7-9 souris par groupe apparaissent sur cette figure. Le test de comparaison multiple de Kruskal Wallis a été utilisé pour comparer le nombre de métastases du poumon (*p<0.05 entre les groupes SNS STI571 et PBS ; ** p<0.05 entre les groupes SNS STI571 et Acm anti-NK1.1 ; PBS contre STI571 n'est pas significativement différent dans les groupes Acm anti-NK1.1).

15

Figure 9 : Le STI571 stimule l'inhibition de la croissance des tumeurs RMA-S dépendante des cellules NK in vivo.

(A, B). FL et STI571 agissent en synergie pour prévenir la croissance de la tumeur RMA-S in vivo.

1×10⁶ cellules RMA-S déficientes, qui sont des cibles des NK (A), ou les cellules RMA TAP-suffisantes, qui ne sont pas des cibles des NK (B), ont été inoculées dans chacun des flancs abdominaux opposés de souris C57BL6 au jour 0. Du jour -6 au jour +3, FL (10µg/jour) ou PBS seul (200 µl) ont été injectés en ip. Du jour +1 au jour +4, le STI571 (150 mg/kg) ou le PBS (200µl) a été administré oralement. Le nombre de souris sans tumeur (sur 5 souris) à la fin de l'expérience est indiqué entre parenthèses.

(C, D). La combinaison de FL+STI571 promeut les effets anti-tumoraux dépendants des cellules NK sur des tumeurs volumineuses établies.

L'anticorps neutralisant anti-NK1.1 Acm (300 µg d'Acm PK136 par souris) a été administré aux jours + 8, +10, +13, +17, +22 et +29. 1×10⁶ cellules RMA-S ont été inoculées dans le flanc abdominal au jour 0. L'administration de FL a

commencé au jour +13 quand les tumeurs ont atteint un diamètre de 50 ± 20 mm². L'administration de FL a été maintenue pendant 10 jours et a été combinée au STI571 des jours +20 à +23 (les mêmes doses que dans A, B). Chaque expérience incluait 5 souris par groupe, a été répétée deux fois et a donné des résultats similaires.

(E). *La combinaison de FL+STI571 induit des effets anti-tumoraux significatifs à l'encontre de AK7.*

3×10^6 cellules de tumeur AK7 ont été inoculées au jour 0 dans le flanc abdominal de souris C57BL6. L'administration de FL a démarré au jour +11 quand les tumeurs AK7 ont atteint un diamètre de 20 ± 20 mm². L'administration a été maintenue pendant 10 jours et FL a été combiné au STI571 le jour précédant l'arrêt de son administration. STI571 a ensuite été maintenu pendant 9 jours consécutifs (les mêmes doses que dans A, B). Chaque expérience incluait 5 à 7 souris par groupe et a été répétée deux fois avec des résultats similaires. Le test de comparaison multiple de Kruskal Wallis a été utilisé pour des analyses statistiques et les effets significatifs sont indiqués par des astérisques.

PARTIE EXPERIMENTALE

20

Matériels et Méthodes :

Purification des cellules NK

25 Les lymphocytes circulants périphériques (PBL) sont contenus dans la fraction non-adhérente des cellules mononucléées du sang périphérique après deux heures d'adhérence. Les cellules NK ont été isolées des PBL par sélection négative magnétique (MACS, NK cell isolation kit, Miltenyi biotec) utilisant des anticorps anti-CD3, anti-CD19, anti-CD14, anti-CD36, anti-IgE couplés à un haptène, puis un marquage secondaire par un anticorps anti-haptène couplé à une microbille. La fraction négative a été obtenue après passage sur une colonne magnétique MidiMACS de type LS+/VS+ (Miltenyi biotec).

30

La pureté de la fraction ainsi déplétée est évaluée par cytométrie de flux. Le phénotypage après purification des NK comprend les anticorps anti CD45, anti CD3, anti CD56. La pureté des NK CD45+ / CD3- / CD56 +, ainsi sélectionnés varie de 85 à 95%.

5

Co-cultures DC/NK

La méthode utilisée a initialement été décrite par Fernandez et al [18].

Les NK purifiés par sélection négative sont placés en culture dans des plaques

10 96 puits (10^5 NK/100 L/puits), fond U pendant 48 heures, selon 4 conditions :

- seuls en milieu RPMI A' [Gibco, 10% de serum AB, 1% de sodium pyruvate 100mM (Gibco-BRL, France), 0,5% de pénicilline-streptomycine 10000UI/mL-10000 g/mL (Gibco-BRL, France) et 1% de L-glutamine 200mM (100X, Gibco-BRL, France)].
- 15 - seuls en milieu RPMI A' contenant 1000UI/ml d'interleukine 2.
- en coculture avec des cellules dendritiques (ratio de coculture DC/NK de 1/1, 1/10, 1/25 ou 1/125 selon).

Evaluation de l'activation et des fonctions NK:

20

Les fonctions NK (cytotoxicité, sécrétion d'IFN γ , régulation positive du CD69) peuvent s'évaluer directement à partir du sang frais après purification sur colonnes, ou préférentiellement après réactivité avec des cellules dendritiques standardisées allogéniques en présence ou non de LPS 10 μ g/ml.

25

Fonctions Cytotoxiques

Les cellules NK sont utilisées comme effecteurs dans un test de cytotoxicité contre Daudi ou K562. Les cellules cibles sont marquées par du chrome 51 (100 μ Ci/10⁶cellules) pendant 1 heure, puis lavées 2 fois. Elles ont ensuite été réparties à 2000 cellules par puits dans des plaques 96 puits à fond V. La libération maximale de chrome 51(Cr₅₁) est obtenue par l'adjonction de

30

cétrimide (Sigma). Les cellules effectrices sont distribuées selon différents ratios effecteurs/cibles et maintenues à 37°C pendant 4 heures. Les surnageants sont prélevés. La cytotoxicité est évaluée par la libération prolongée spécifique de chrome 51 dans les surnageants (lecture par un compteur de radiation gamma : Topcount, Packard) : libération spécifique de Cr_{51} = [libération de Cr_{51} de l'échantillon - libération spontanée de Cr_{51} par les cibles] / [libération maximale de Cr_{51} - libération spontanée des cibles].

Sécrétion de cytokines

Certaines cellules NK activées sécrètent de l'interféron (IFN). De même, les cellules dendritiques immatures allogéniques (batchs standardisés), mises en présence de cellules NK préalablement activées [par une cause classique (IL-2, IL-12, matures DC) ou non (GIST sous STI571)] sécrètent des ng de $TNF\alpha$. Afin de doser ces cytokines, les surnageants des cocultures DC/NK sont analysés en dosage ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay- kit OptEIA IFN et $TNF\alpha$ humain- Pharmingen). Les anticorps anti-IFN et anti- $TNF\alpha$ sont ensuite incubés pendant une nuit à 4°C sur une plaque 96 puits maxisorb. Après lavage et saturation des anticorps par une solution « d'Assay diluent », les échantillons sont incubés pendant 2 heures. La plaque est ensuite lavée en PBS/tween 20, 0,05%. Un anticorps de détection dirigé contre un second épitope de l'IFN ou du $TNF\alpha$, couplé à la biotine permet de détecter ces cytokines. La révélation est effectuée par une réaction streptavidine biotine. La lecture de la densité optique est réalisée à 450 nm. Une correction est réalisée à 550 nm. Une gamme d'IFN et de $TNF\alpha$ standardisée permet la conversion de la densité optique en pg/mL.

Etude phénotypique des marqueurs d'activation

Lorsque les cellules NK sont activées, elles peuvent exprimer à leur surface la molécule CD69 (lectine de type C). Afin d'évaluer la présence de ce marqueur d'activation, 5×10^4 à 1×10^5 cellules NK sont marquées pour analyse en

cytométrie de flux. Les anticorps utilisés sont les anti-CD56, anti-CD3, anti CD69. Les contrôles isotypiques sont réalisés pour chaque manipulation.

5 Mise en évidence de l'amplification élective de sous populations NK in vivo chez les GIST traités

Après purification des NK périphériques des patients, un immunomarquage est effectué avec les Anticorps anti-CD3, CD56 et CD16. L'augmentation de la sous population CD16^{dim}, CD56^{bright} est mise en évidence, passant de 5% (pré-STI) à
10 éventuellement 18% sous STI571.

Exemple 1 : Mise en évidence de l'activation des cellules NK chez les patients GIST traités par STI571.

15

Le sang et les tumeurs ont été obtenus auprès du CCPPRB, chez des patients GIST en phase II placés sous STI 571.

La fonction des cellules NK fraîchement extraites par déplétion négative
20 (méthode Miltenyi) du sang circulant des patients porteurs de GIST traités (n=31) ou non (n=14) par STI571 (400 ou 600 mg/j depuis 2-4 ou 6 mois) ou de volontaires sains VS (n=17) a été évaluée. Les cellules NK ont été soumises à une incubation avec des cellules dendritiques immatures allogéniques standardisées en présence ou non de 10µg/ml LPS. Après 48hrs, un test de
25 lyse des K562, DAUDI ou des CD immatures à divers ratios effecteurs/cibles ainsi qu'à un dosage d'IFN γ et TNF α dans les surnageants de coculture (selon les procédés proches de ceux suggérés dans Gerosa et al. (JEM 195 (2002) 327) ou Piccioli et al. (JEM 195 (2002) 335).

30 De façon intéressante, dans 30 à 55% des cas, les cellules NK des patients GIST sous STI571 présentent la capacité de produire l'IFN γ et de déclencher l'activation des CD immatures (sécrétion de TNF α ng/ml) *in vitro*, au contraire

des cellules NK de volontaires sains (VS) ou de patients GIST non traités (Tableau 1, Fig. 1). De telles activations NK après coculture avec les CD sont aussi reflétées en capacité lytique. L'étude longitudinale sur 7 patients montre par ailleurs clairement l'acquisition de l'activation NK après administration de
5 STI571 (Fig. 1). La corrélation entre l'effet biologique immunomodulateur et l'effet clinique du STI571 est illustrée dans le Tableau 2, qui démontre que tous les patients répondant au traitement présentent des cellules NK activées.

Dans une série préliminaire impliquant une quarantaine de cas, les inventeurs
10 ont ainsi observé que le STI571 active les fonctions NK en présence de GIST et possède donc une activité immunomodulatrice en plus de ses fonctions inhibitrices des activités tyrosine kinases.

15 **Exemple 2 : Mise en évidence d'une action du STI571 sur les cellules dendritiques, pouvant rendre compte de l'activation des cellules NK**

Puisque les cellules dendritiques sont, au contraire des macrophages, des précurseurs myéloïdes ou lymphoïdes électivement capables d'activer les NK
20 au repos, nous avons testé les capacités du STI571, administré à raison de 10^{-6} M, 10^{-8} M et 10^{-10} M, à moduler cette propriété.

Les cellules dendritiques humaines dérivées des CD34+ en SCF, GM-CSF, $\text{TNF}\alpha$ qui n'activent pas les NK humaines, acquièrent fortement cette capacité lorsqu'elles sont incubées 24 heures de J12 à J13 avec le STI571 à 10^{-6} M (Fig
25 2).

Dans un système murin, la sécrétion d' $\text{IFN}\gamma$ par les NK est augmentée de 2 à 3 fois à un ratio CD : NK de co-culture de 1 : 1. En revanche, alors qu'à un ratio de co-culture CD : NK de 1 : 10, les CD non traitées n'activent plus les NK, la CD-STI571 possède encore fortement cette propriété. De plus, seul le STI571 et
30 non l'AG957 (Tyrphostin, un inhibiteur non spécifique des tyrosine kinases) induit l'activation des NK via les CD *in vitro* (Fig. 3). Ces données peuvent être reproduites en utilisant un analogue structural du STI 171, le AB1003 (Fig. 4).

Ainsi, les cellules dendritiques ou précurseurs, humaines ou murines, sont la cible potentielle du STI571 *in vivo* chez les patients GIST sous STI571. En effet, les demandeurs ont démontré que le STI571 n'active pas directement les NK *in vitro*.

5

Exemple 3 : L'injection *in vivo* de cellules dendritiques traitées avec du STI571 induit une activation des cellules NK

- 10 L'administration de CD *in vivo* permet de moduler l'activation des cellules NK des organes lymphoïdes (ganglions drainant si injectées en sous cutané, rate si injectées en intra veineuse). L'incubation pendant 24 heures des CD différenciées avec le STI571 avant l'injection *in vivo* permet de potentialiser le recrutement et l'activation NK *in vivo* (pourcentage de cellules Dx5+/CD3-
15 acquérant le CD69) (Fig. 5).

Les expériences chez la souris démontrent que le STI571 augmente d'un facteur 10-30 la capacité des CD à entraîner la sécrétion d'IFN γ par les NK au repos *in vitro* et à activer les NK *in vivo*.

20

Exemple 4 : L'injection *in vivo* de STI571 et d'un facteur de croissance des CD induit une activation des cellules NK

- Les inventeurs ont combiné le STI571 au Flt3L (facteur de croissance
25 hématopoïétique des CD *in vivo*) dans le but de tester si cette association ~~pouvait conduire à l'activation~~ des cellules NK, et à l'éradication de tumeurs NK sensibles, indépendamment d'une mutation c-kit, abl ou du récepteur au PDGF.

- Les fonctions NK des foies et rates des animaux traités ont été évaluées de
30 diverses façons (%CD69 sur les CD3-/Dx5+, activités lytiques directes des foies et rates sur YAC-1, sécrétion d'IFN γ des organes lymphoïdes traités *in vitro* 24hrs par IL-2). Les activités lytiques spontanées des splénocytes de souris

Nude traitées par l'association Flt3L+STI571 se sont révélées, de façon surprenante, supérieures à celles des souris Nude traitées par Flt3L seul, STI571 seul ou PBS (Fig. 6). L'augmentation du CD69 sur les NK est claire avec la combinaison Flt3L+STI, alors qu'elle ne l'est pas avec chacun des composants pris isolément. La production d'IFN γ est surtout visible dans les cultures de ganglions provenant des animaux ayant reçu Flt3L+STI571 (Fig6). La combinaison STI571 - Flt3L permet donc d'induire in vivo une activation importante de l'activité des cellules NK, permettant la lyse efficace de cellules pathologiques in vivo.

10

Exemple 5 : Le STI571 bloque la maturation des CD induite par le LPS et prévient le choc septique

Les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (« BM-DC ») de souris H-2b (par culture en présence de GM-CSF, IL-4 à J7 de culture, selon la méthode décrite dans Fernandez et al. Nat. Med. 5 (1999) 405) sont incubées 24 heures en présence de 10 μ g/ml LPS. Elles surexpriment ainsi I-Ab, CD40, CD80, CD86 de façon très significative. Elles stimulent de façon spectaculaire la prolifération de splénocytes totaux allo-réactifs (H-2d) à divers ratios E:T (réaction de type MLR). La co-incubation de STI571 (et non de AG957) avec les BM-DC en concomittante présence de LPS prévient la maturation LPS induite et les alloproliférations (Figure 7A).

La propriété de ces inhibiteurs de tyrosine kinases à inhiber les signaux inflammatoires tels le LPS a également été investiguée in vivo, dans le modèle murin du choc endotoxinique (Fig.7B). Des souris C57BL6 ont été traitées par ingestion per os de STI 571 (150mg/Kg/12h) ou par PBS. Au décours des 24 premières heures du traitement, on induit un choc endotoxinique au moyen d'une injection intrapéritonéale de LPS (1 mg, sérotype O26 :B26 ;SIGMA). Les traitements par STI 571 ou PBS sont poursuivis pendant 48 heures supplémentaires. Nos résultats préliminaires permettent d'observer une réduction de la mortalité dans le groupe traité par STI 571 (45% vs. 17,6%).

Tableau 1

Conditions de Culture **	Sécrétion d'interféron γ *		Sécrétion de TNF α *		Lyse Spécifique de K562	
	- LPS	+ LPS	- LPS		- LPS	+ LPS
GIST avant STI 571 (N=14)	0%	16,7%	0%		15,4%	38,5%
GIST pendant STI 571 (N=31)	30%*	56,7%* [∇]	21,7%*		45,8%	62,5%
Volontaires sains (N=17)	11,1%	11,1%	10%		30,8%	42,9%

- 5 * Significatif avec un intervalle de sécurité de 95% selon la méthode exacte de Fisher, comparé au GIST avant STI 571
- ∇ Significatif avec un intervalle de sécurité de 95% selon la méthode exacte de Fisher, comparé aux volontaires sains
- *Seuil de positivité défini à 100 pg/ml
- 10 ** Les fonctions des cellules NK sont évaluées après incubation de cellules NK CD3-/CD56+ du sang périphérique avec des cellules dendritiques immatures allogéniques en présence ou en l'absence de LPS.

Tableau 2

	Maladies progressives	Maladies stabilisées ou en réponse
Patients biologiquement sensibles au STI 571	0	16
Patients biologiquement non sensibles au STI 571	5*	11

15

*Test exact de Fisher : p=0,042.

Exemple 6 : Le STI571 exerce un effet thérapeutique à l'encontre des tumeurs GIST NK-sensibles non liées à une mutation constitutive dans une tyrosine kinase.

Les tumeurs GIST sont les néoplasmes mésenchymateux les plus communs du tractus gastro-intestinal. Les mutations somatiques (apportant une fonction) des protooncogènes KIT ou PDGFA, sont présentes dans 92% des GIST [B.P. Rubin *et al.*, *Cancer Res.* 61, 8118 (2001) et M.C. Heinrich, *et al.*, *Science*, 299, 708 (2003)]. Le STI571 stabilise la maladie ou induit des réponses partielles dans 80% des patients GIST [G.D. Demetri *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 347, 472 (2002)]. Toutefois, certains GIST ne répondent pas in vitro au STI571 ou deviennent résistants. Des études longitudinales de patients atteints de GIST traités au STI571 ont maintenant révélé l'augmentation, induite par thérapie, de la production d'IFN γ par les cellules NK, corrélée à une augmentation de la réponse anti-tumorale. Ainsi, dans un essai de phase II, plusieurs des patients répondant de façon significative au STI571 ne présentaient aucune mutation de KIT ou de PDGFRA (cf. tableau 3). En plus de son activité anti-tumorale, le STI571 agit donc indirectement sur les cellules hôtes exprimant KIT en dehors de la tumeur. Plusieurs modèles de tumeurs résistantes in vitro aux effets anti-prolifératifs du STI571, mais sensibles in vivo ont ainsi été identifiés. Ainsi, le mélanome B16F10, le lymphome RMA-S, le fibrosarcome MCA102 et le mésothéliome AK7 résistent au STI571 in vitro (Fig. 8A) mais leur croissance naturelle dans des souris C57BL6 est significativement empêchée après 8 jours de traitement oral à l'aide de STI571, à la fois pour l'expansion sous-cutanée des tumeurs AK7 et MCA102 (Fig. 8B), et pour l'établissement des métastases B16 du poumon (Fig. 8C). Dans ce contexte, les cellules NK sont des médiateurs critiques des effets anti-tumoraux du STI571. Les tumeurs réfractaires aux effets anti-prolifératifs du STI571 in vitro répondent aux FL+STI571 in vivo d'une manière dépendante des cellules NK. Ainsi, la combinaison du FL et du STI571 supprime complètement la tumeur chez 100%

des souris (Fig. 9A). La déplétion des cellules NK1.1⁺ supprime l'effet thérapeutique de FL+STI571 (Fig. 9C, D). FL+STI571 exerce un effet thérapeutique à l'encontre des tumeurs établies atteignant une taille de 150±20 mm² (Fig. 9C). Les effets thérapeutiques synergiques de FL+STI571 ont également été démontrés pour le mésothéliome AK7 (Fig.9E).

Tableau 3. Réponses Cliniques STI571 dans les tumeurs ne présentant pas de mutation* cibles du STI571.

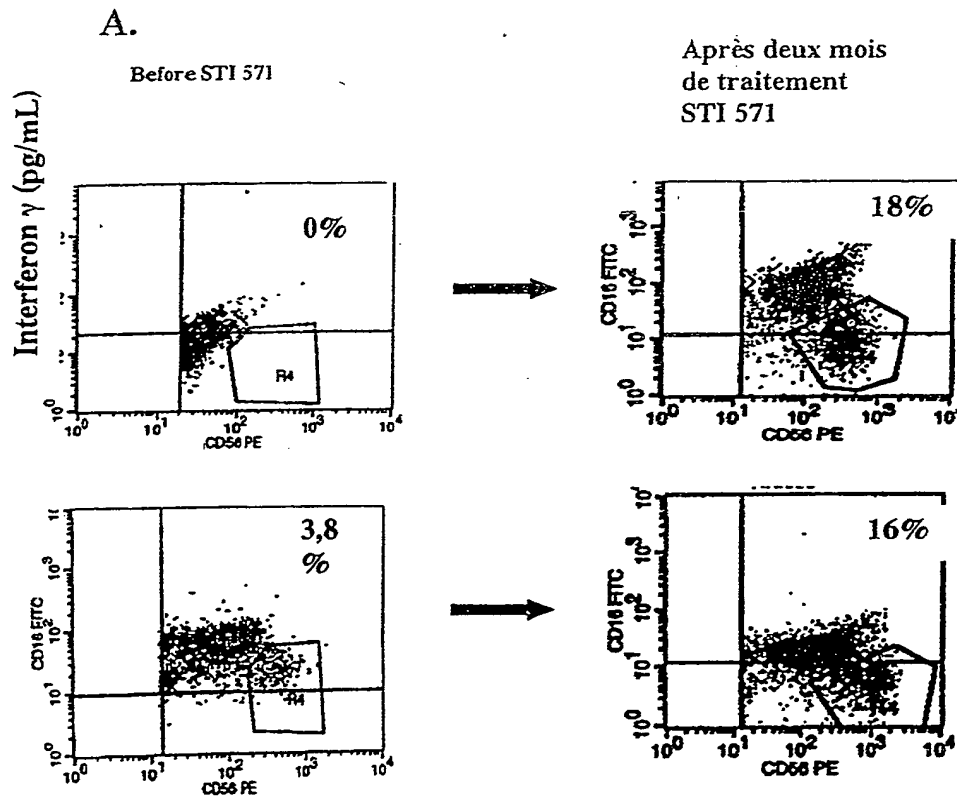
Patients	Age (années)	Statut	Site impliqué	Taille de la tumeur (mm)	Durée des réponses (mois)	Réponses cliniques	Activité NK stimulée
A	50	0	Foie Estomac	45x41 53x62	26 [§]	CR CR	OUI
B	60	0	Foie	32x33 19x13	24 [§]	PR PR	OUI
C	48	0	Poumons	16x13	26 [§]	CR	OUI

* les mutations cibles sont des mutations affectant dans KIT les exons 9, 11, 13, 17 et dans PDGFRA les exons 12, 14 et 18 (6). [§] Patients toujours en vie au moment de l'évaluation.

REVENDICATIONS

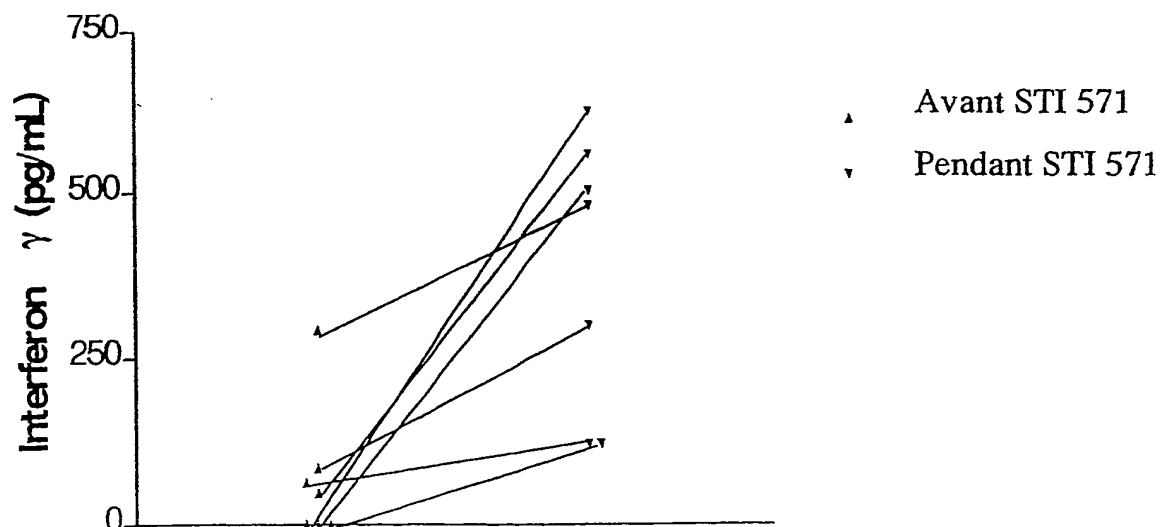
- 5 1. Utilisation d'un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF, pour la préparation d'une composition destinée au traitement prophylactique ou curatif des tumeurs NK sensibles non liées à une mutation constitutive dans une tyrosine kinase.
- 10 2. Utilisation d'un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF, pour la préparation d'une composition destinée au traitement prophylactique ou curatif des maladies inflammatoires.
- 15 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le mammifère est un être humain.
- 20 4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'inhibiteur est un composé de la famille des pyrimidines.
- 5 5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'inhibiteur est la 2-phénylaminopyrimidine (STI571) ou un dérivé ou analogue de celui-ci.
- 25 6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'analogue du STI571 est le AB1003.
- 30 7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'inhibiteur est utilisé de façon combinée à un agent potentialisant.

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit agent potentialisant est choisi parmi un facteur de croissance des cellules dendritiques et un facteur de (co-)stimulation des cellules NK.
- 5 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit agent est choisi parmi le Flt3L, le GM-CSF, le ProGP-4 et leurs dérivés ou analogues.
- 10 10. Utilisation selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce que ledit agent est utilisé de façon simultanée ou différée dans le temps par rapport à l'inhibiteur.
- 15 11. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF et un agent potentialisant.
- 20 12. Composition selon la revendication 11, comprenant du STI571 ou du AB1003 et un facteur de croissance des cellules dendritiques ou un facteur de (co-)stimulation des cellules NK.
13. Composition comprenant des cellules dendritiques traitées par un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit et/ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF.
- 25 14. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce que les cellules dendritiques sont immatures.



B. Interferon γ secretion after culture with mature dendritic cells

Figure 1



2/12

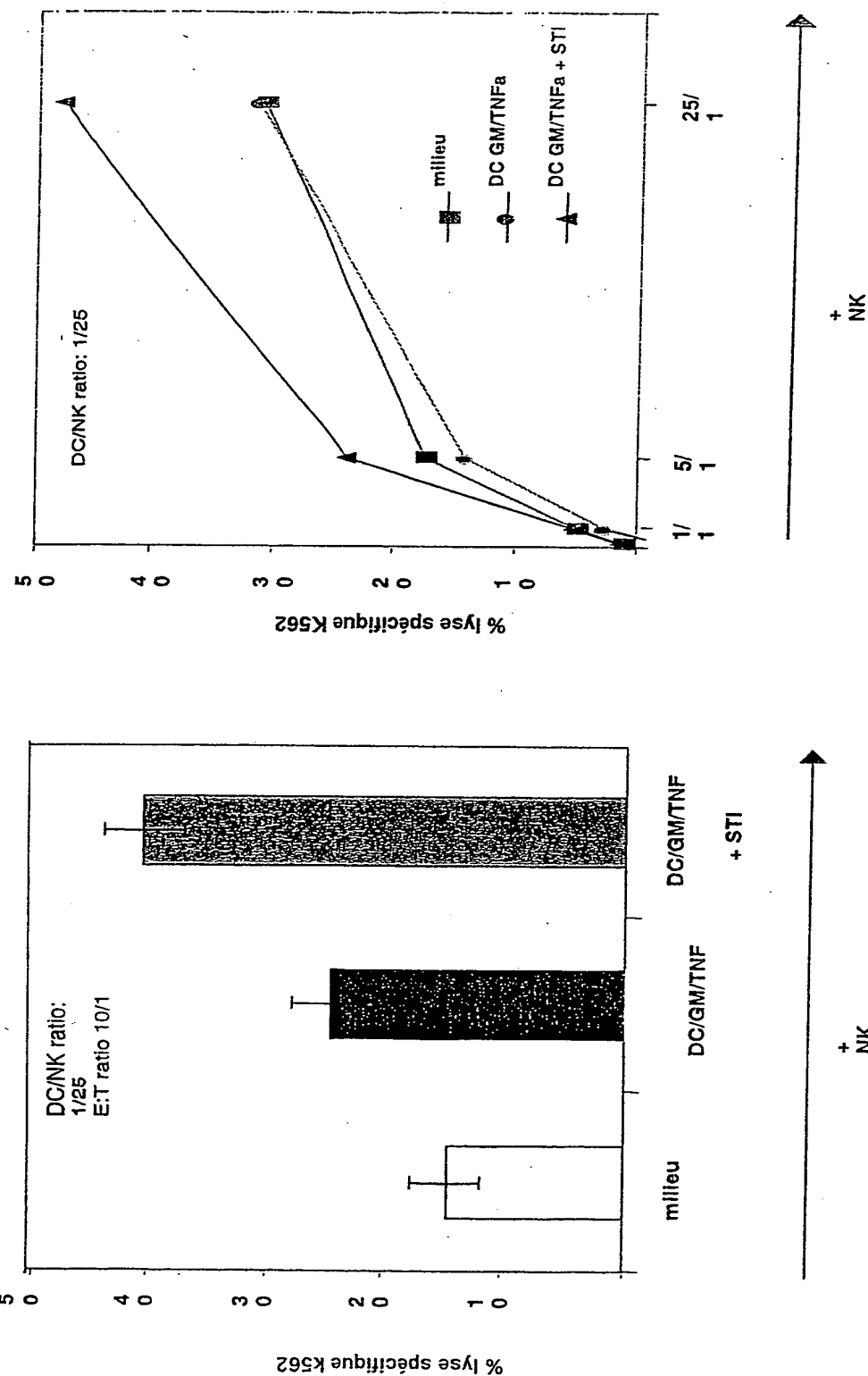


Figure 2

3/12

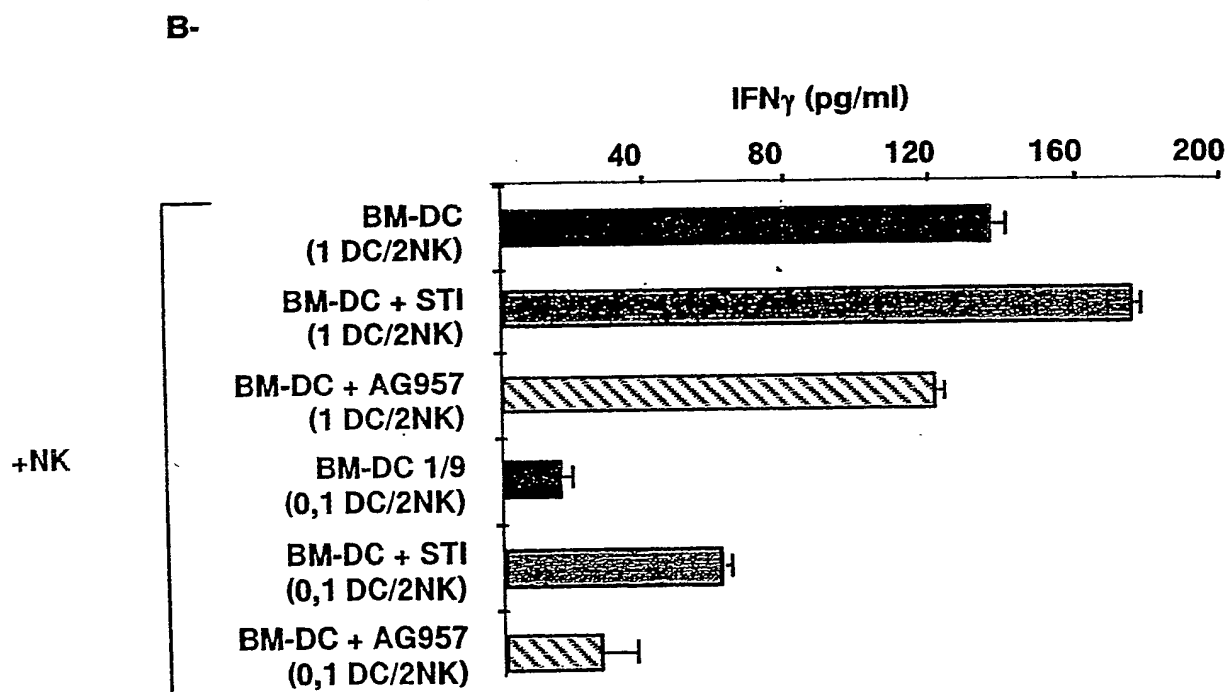
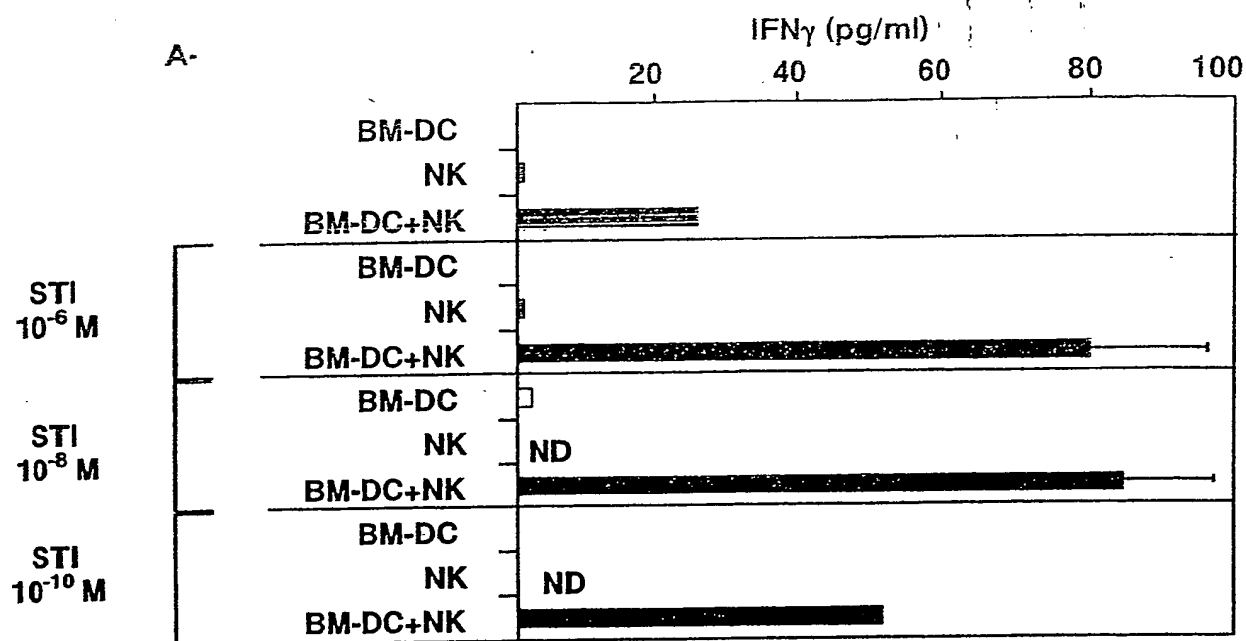


Figure 3

4/12

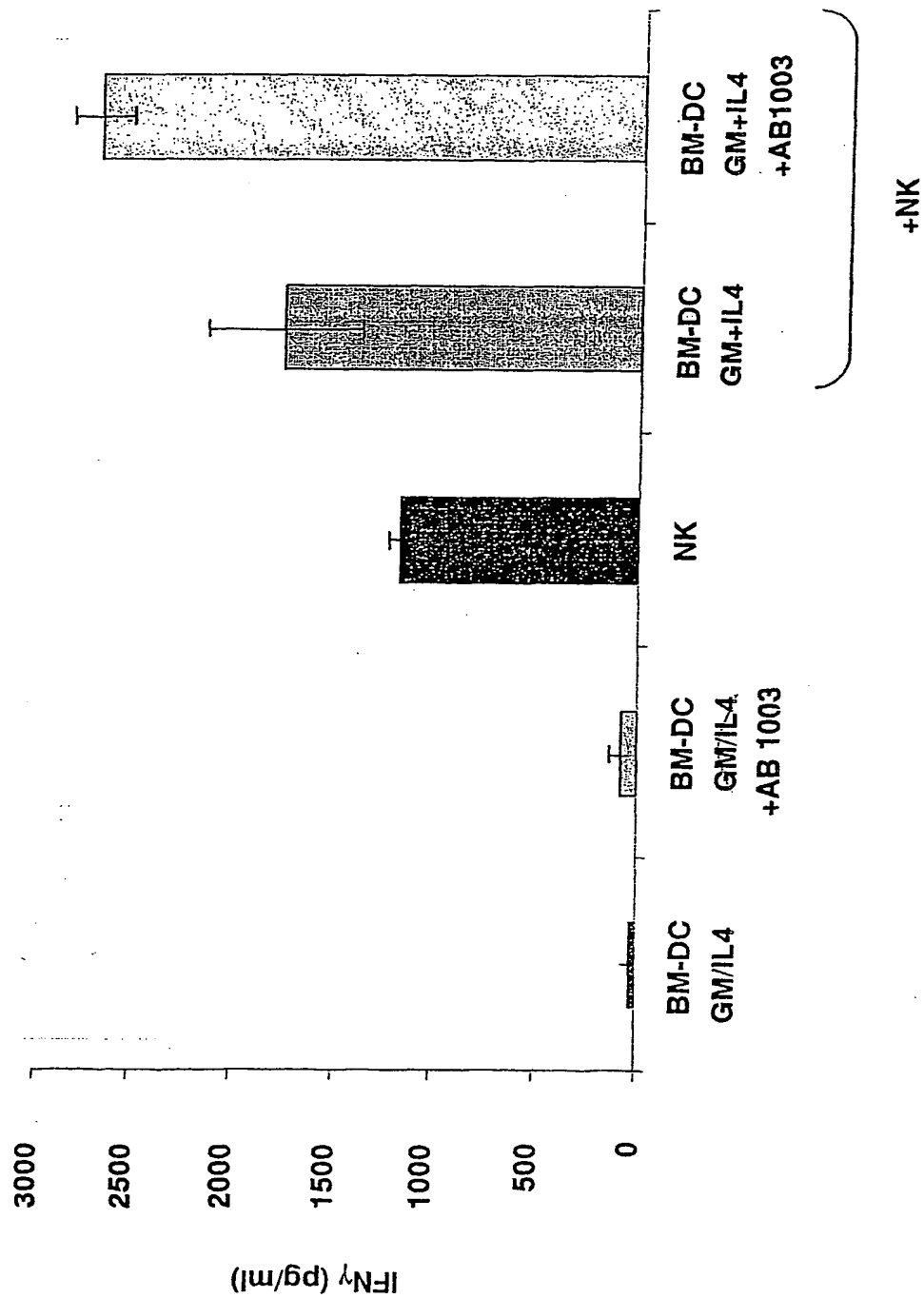


Figure 4

5/12

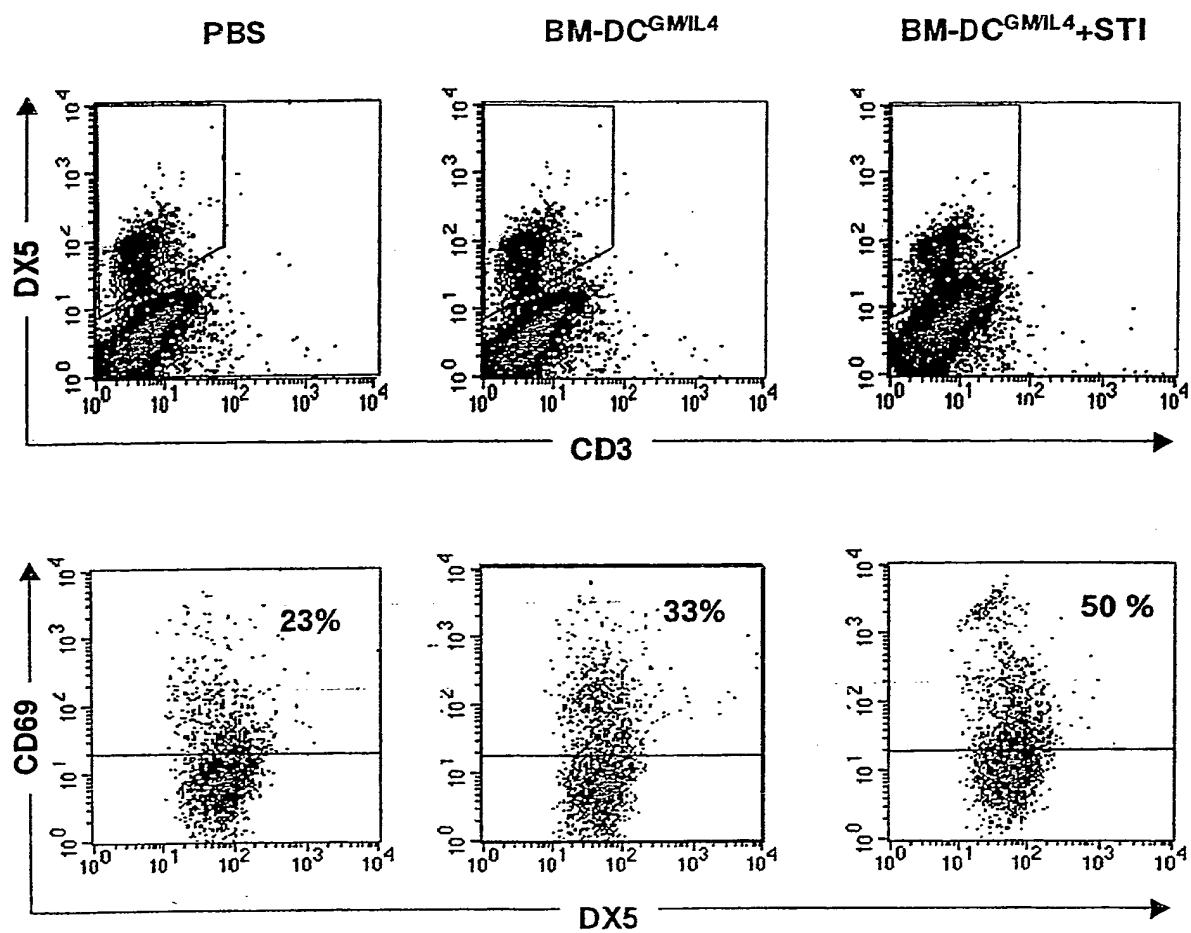


Figure 5

6/12

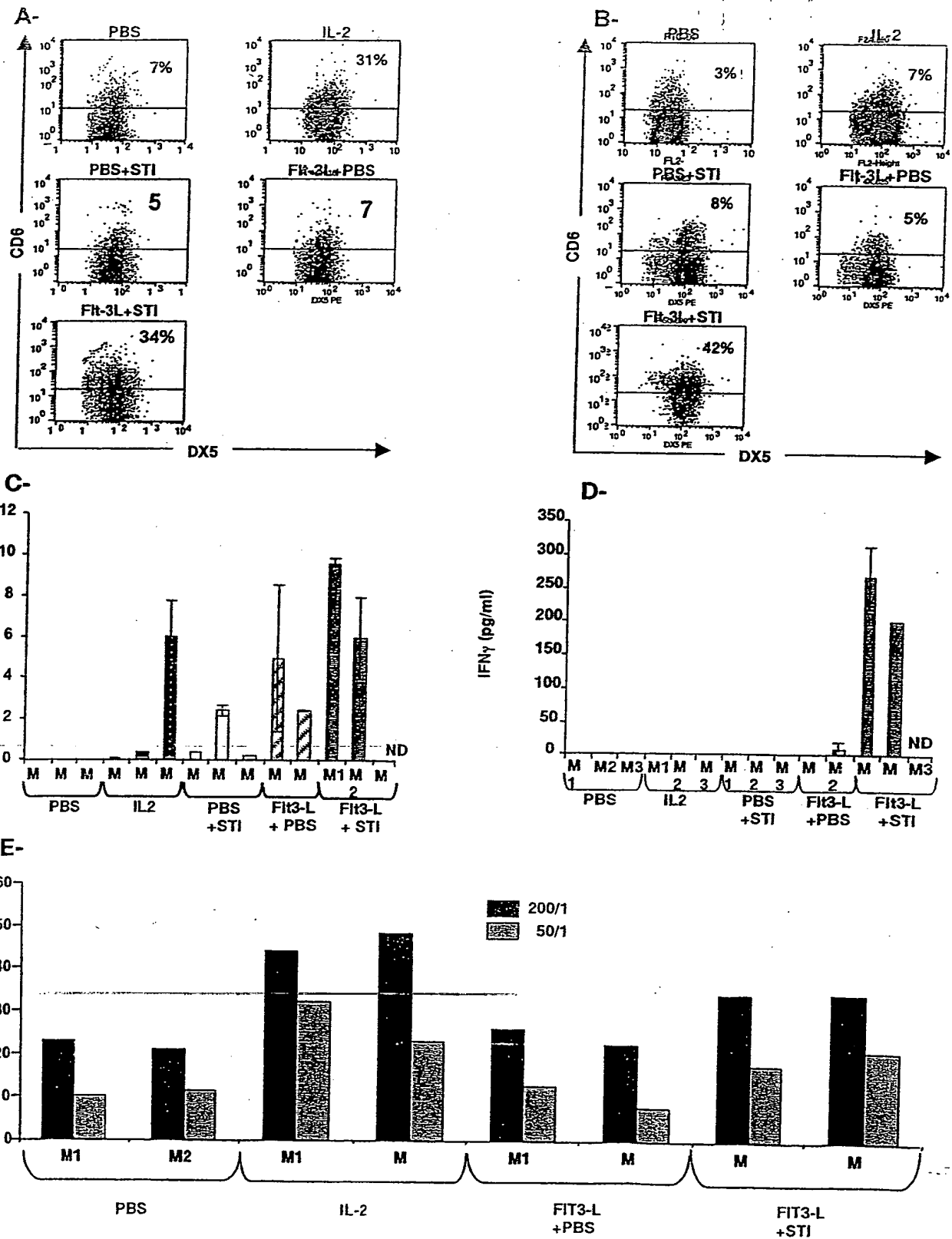
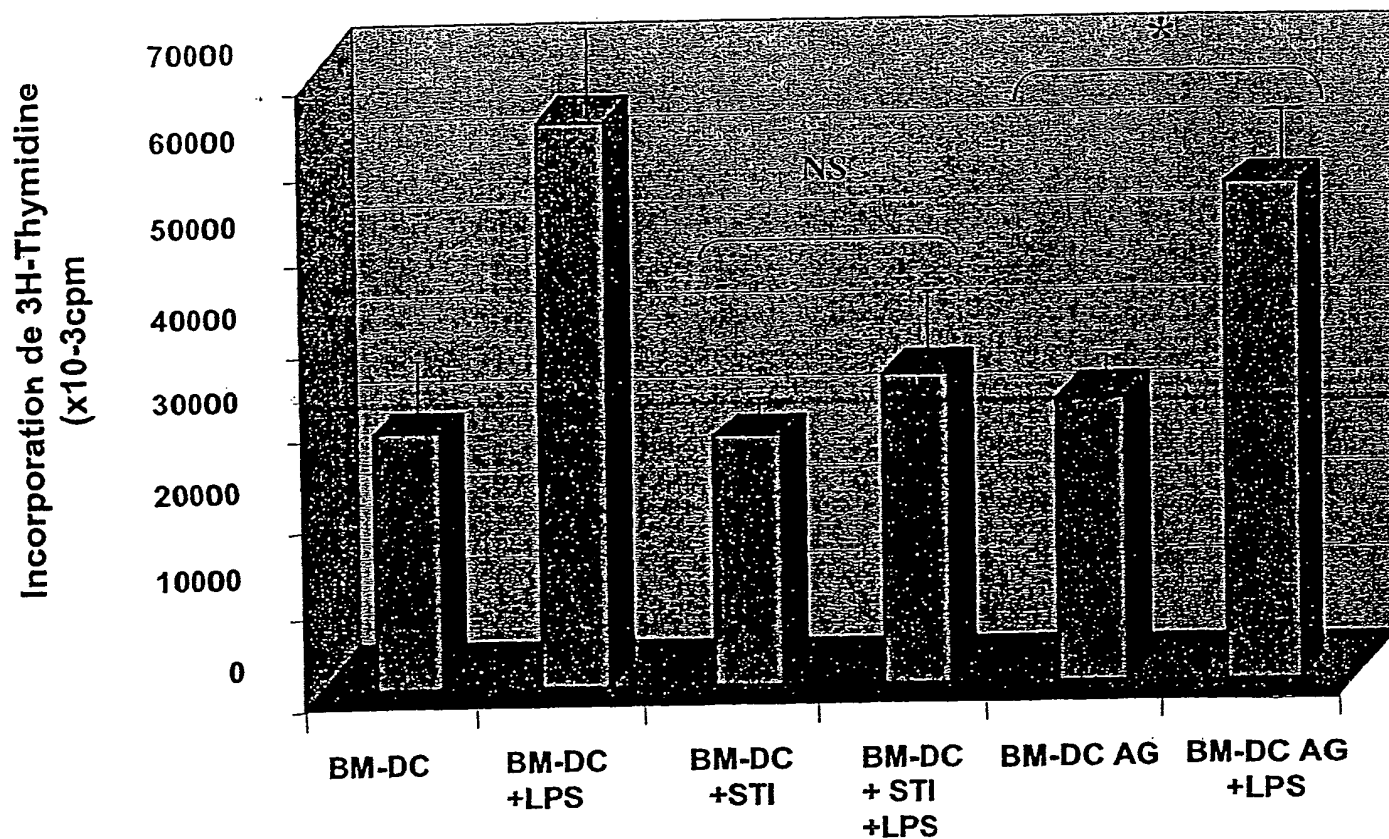


Figure 6

7/12

A.



B.

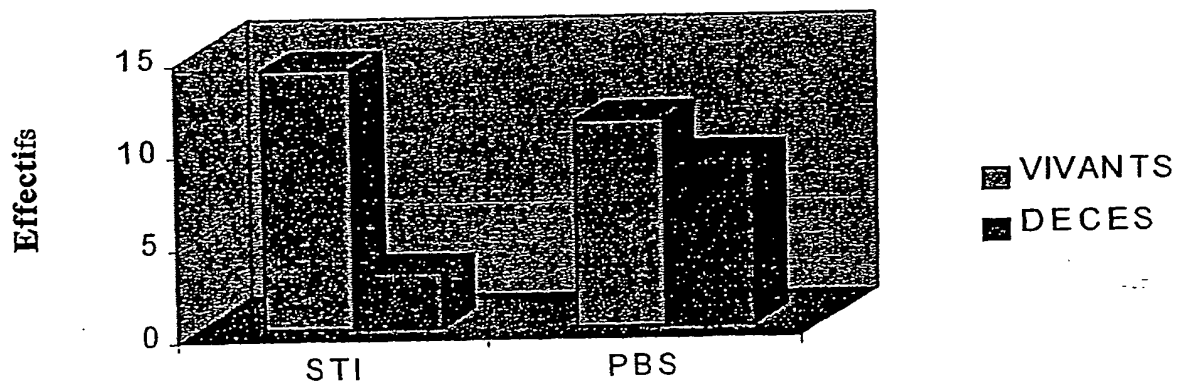
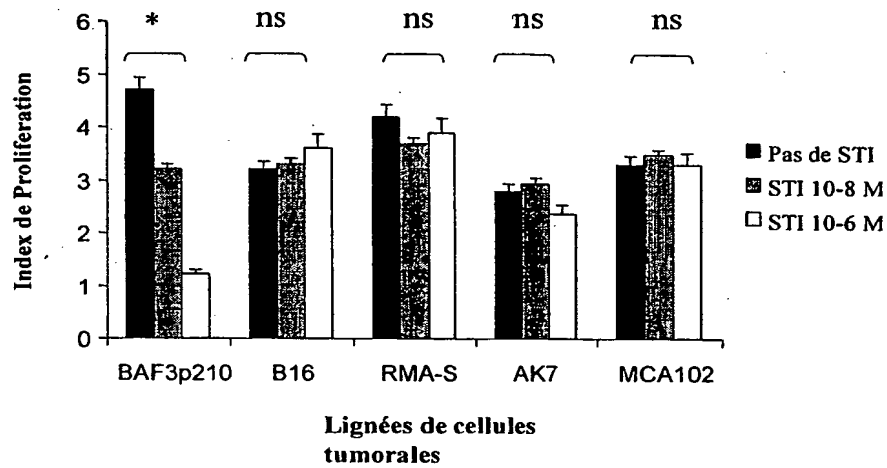


Figure 7

8/12

A



B

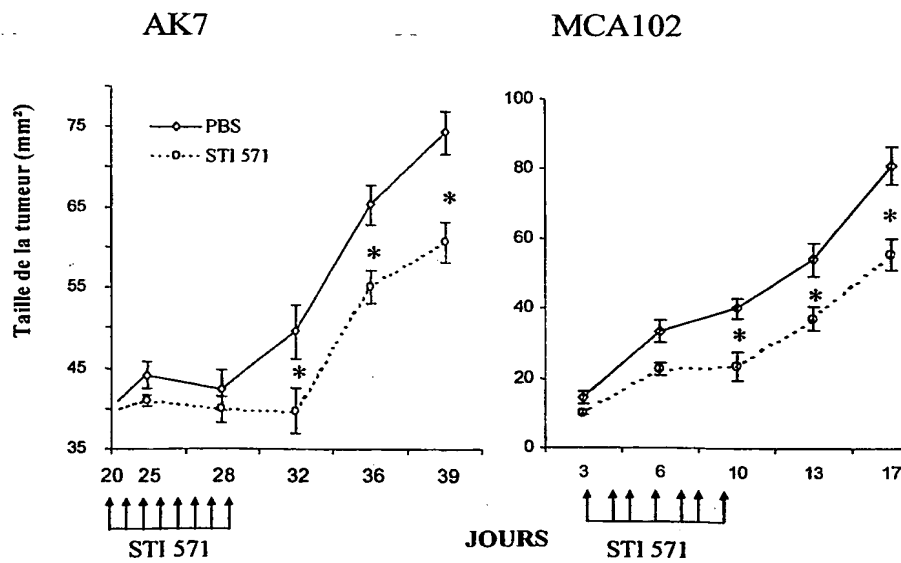


Figure 8

9/12

C

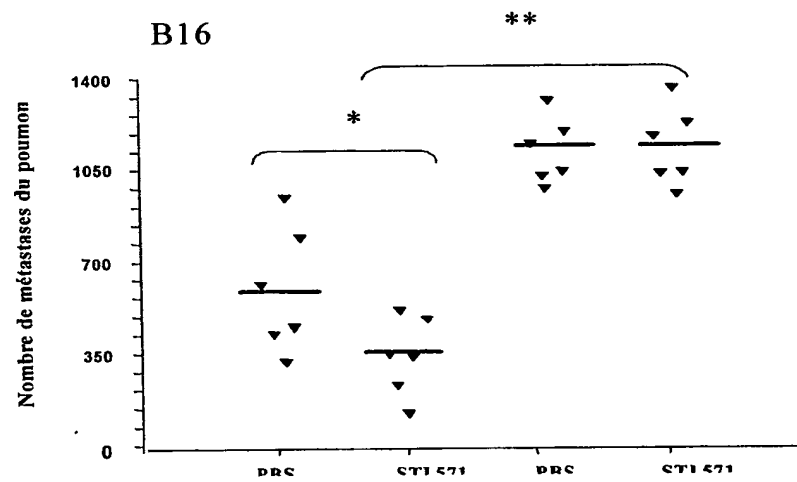


Figure 8

10/12

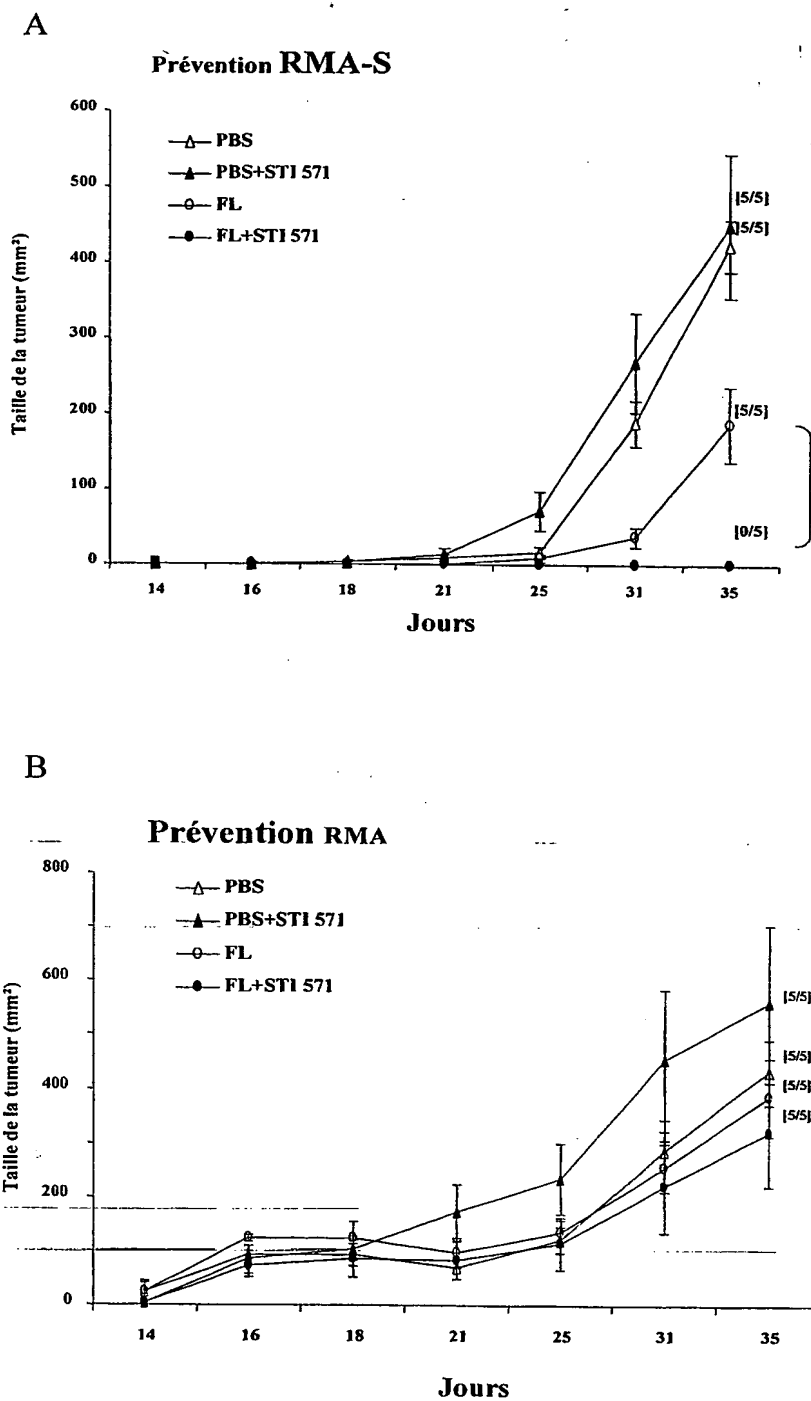
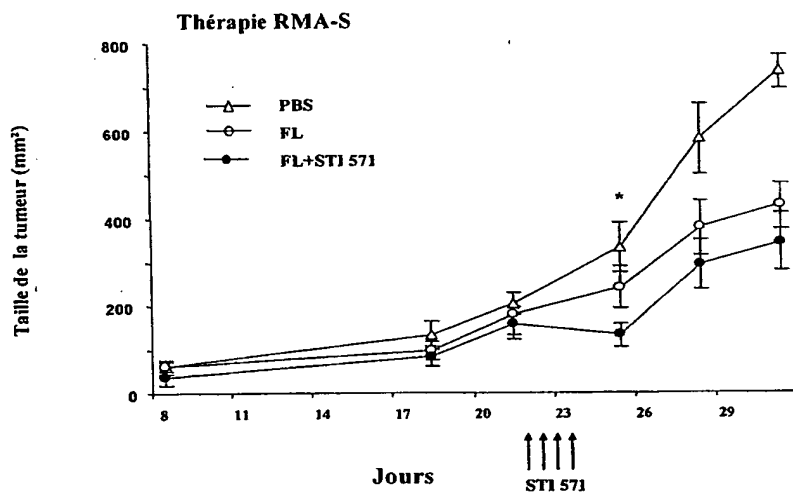


Figure 9

11/12

C



D

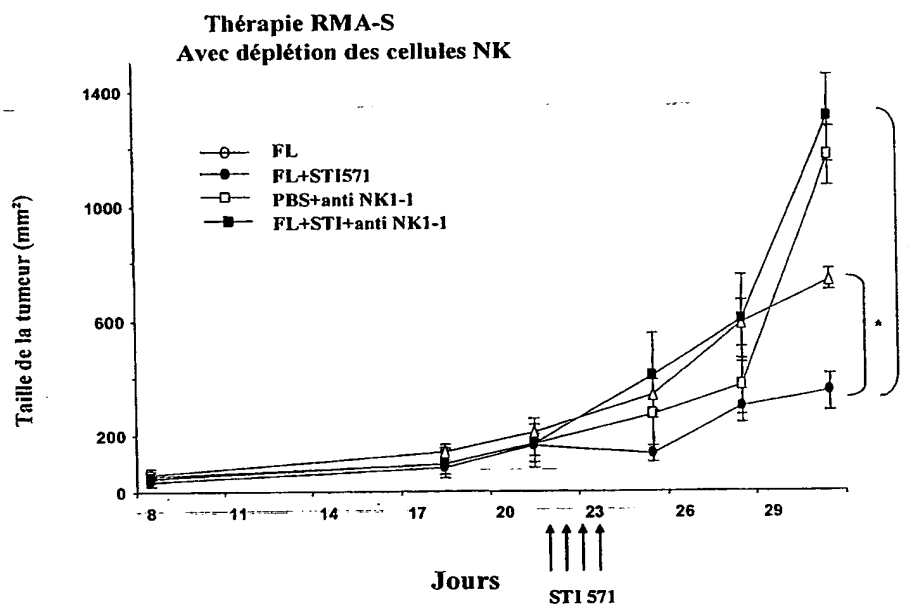


Figure 9

12/12

E

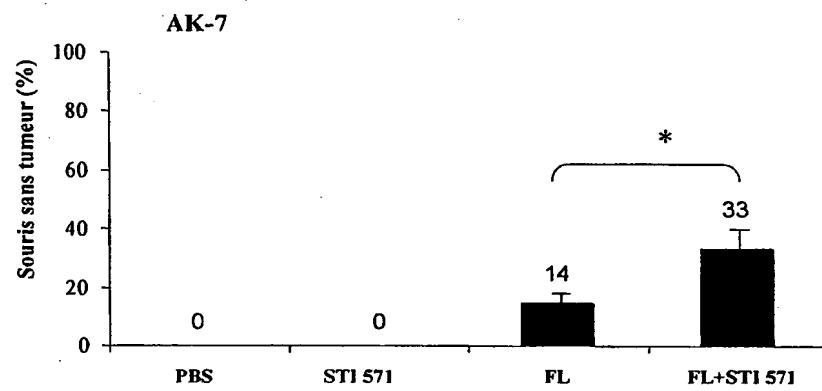


Figure 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
1 avril 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/026311 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/506, A61P 11/06, 35/00, 31/12, 29/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002744

(22) Date de dépôt international :
17 septembre 2003 (17.09.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/11545 18 septembre 2002 (18.09.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (IGR)** [FR/FR]; 39, rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ZITVOGEL, Laurence** [FR/FR]; 17, rue du Nord, F-92160 Antony (FR). **AUCLAIR, Christian** [FR/FR]; 3, avenue Boudon, F-75016 Paris (FR). **TURSZ, Thomas** [FR/FR]; 34, rue Gazan, F-75014 Paris (FR).

(74) Mandataires : **BECKER, Philippe** etc.; Cabinet Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 12 août 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF SPECIFIC INHIBITORS OF TYROSINE KINASES FOR IMMUNOMODULATION

(54) Titre : UTILISATION D'INHIBITEURS SPECIFIQUES DE TYROSINE KINASES POUR L'IMMUNOMODULATION

(57) Abstract: The invention relates to the use of inhibitors of tyrosine kinases for immunomodulation, i.e. for regulation of the activity of immune cells in patients. The invention more particularly relates to the use of specific inhibitors of tyrosine kinases in the preparation of a composition for preventing or treating viral infections sensitive NK tumors, immune diseases and/or septic shock in mammals. Said inhibitors question are more particularly inhibitors of tyrosine kinases c-abl (bcr/abl), c-kit and /or tyrosine kinase associated with the PDGF receptor. The invention also relates to compositions comprising one such inhibitor, combined with other active agents, i.e. agents which can potentiate the inhibiting effect. The invention can be used in a preventative or curative manner, in vivo ou ex-vivo.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinases pour l'immunomodulation, notamment pour réguler l'activité de cellules immunitaires chez des patients. Elle concerne plus particulièrement l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinases pour la préparation d'une composition destinée à la prévention ou au traitement d'infections virales, de tumeurs NK sensibles, de maladies immunitaires et/ou du choc septique chez un mammifère. Les inhibiteurs concernées sont plus particulièrement des inhibiteurs des tyrosine kinases c-abl (bcr/abl), c-kit et /ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF. L'invention décrit également des compositions comprenant un tel inhibiteur, en combinaison avec d'autres agents actifs, notamment des agents capables de potentialiser l'effet de l'inhibiteur. L'invention est utilisable de manière préventive ou curative, in vivo ou ex-vivo.

WO 2004/026311 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02744

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/506 A61P11/06 A61P35/00 A61P31/12 A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/10339 A (OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVER ; ORTHO MCNEIL PHARM INC (US)) 7 February 2002 (2002-02-07) page 1, lines 10-13 page 9, lines 10-21 page 50, line 1 - page 51, line 3 claims 1,2,12	1,3-5,7, 10,11
X	WO 94/11392 A (WARNER LAMBERT CO) 26 May 1994 (1994-05-26) page 1, line 10 page 5, lines 2-5 claims 1,15,16	1,2
X	WO 02/45717 A (TULARIK INC) 13 June 2002 (2002-06-13) claims 1,5,6,8-11	1-5,7, 10,11
	- / - -	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"B" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 February 2004

Date of mailing of the international search report

24.05.04

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Veronese, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02744

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/34727 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ;NOVARTIS AG (CH); BUCHDUNGER ELISABE) 2 May 2002 (2002-05-02) page 3, paragraph 2; claims claims 1,2 page 2, paragraph 2-4	1,3-5
X	WO 01/45689 A (SUGEN INC ;LIPSON KEN (US); MCMAHON GERALD (US)) 28 June 2001 (2001-06-28) page 4, lines 16,17 page 27, lines 1,27 page 28, line 23 page 29, line 22 page 31, line 22 claims 1,3-5	1-3
X	PENG D ET AL: "TRIPLE COMBINATION WITH STI571 (GLEEVEC), TRASTUZUMAB (HERCEPTIN) AND CETUXIMAB (IMC-C225): A TREATMENT MODEL FOR BREAST CANCER THROUGH MODULATION OF GROWTH FACTOR RECEPTORS AND TYROSINE KINASES SIGNALING" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 43, March 2002 (2002-03), page 846, XP001147889 ISSN: 0197-016X abstract	11
E	WO 03/002109 A (MOUSSY ALAIN ;SCIENCE AB (FR); KINET JEAN-PIERRE (US)) 9 January 2003 (2003-01-09) page 1, lines 1-10 page 8, lines 15-20; claims 1,39,40	1,2,7,11
A	"FDA APPROVES GLEEVEC FOR LEUKEMIA TREATMENT" FDA CONSUMER, US DEPT. OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, PUBLIC HEALTH SERVI, US, vol. 4, July 2001 (2001-07), page 6, XP001145627 ISSN: 0362-1332 abstract	1
T	"Gleevec therapy in c-KIT negative soft tissue sarcomas: a molecular rationale" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 38, November 2002 (2002-11), page S56, XP004403617 ISSN: 0959-8049 abstract	1,2

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02744

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 198 13 760 A (MULTHOFF GABRIELE) 7 October 1999 (1999-10-07) the whole document	7, 8, 10-12
Y	US 5 348 739 A (HERMODSSON SVANTE H ET AL) 20 September 1994 (1994-09-20) the whole document	7, 8, 10-12

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 3-12 (partially), 1 (in full)

Use of an inhibitor of tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit and/or PDGF receptor-associated tyrosine kinase alone or in a mixture with a potentiating agent for preparing a composition for treating or preventing NK-sensitive tumours not linked to a constitutive mutation in a tyrosine kinase.

2. claims: 3-12 (partially), 2 (in full)

Use of an inhibitor of tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit and/or PDGF receptor-associated tyrosine kinase alone or in a mixture with a potentiating agent for preparing a composition for treating or preventing inflammatory diseases.

3. claims: 13-14 (in full)

Composition including dendritic cells treated with an inhibitor of tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit and/or PDGF receptor-associated tyrosine kinase.

Continuation of Box I.2

Claim nos.: -

The definition "potentiating agent" and the definition "NK-sensitive tumours not linked to a constitutive mutation in a tyrosine kinase" are unclear and encompass a very wide variety of compositions. In fact, the claims contain so many options, variables, possible permutations and provisos, and the resulting lack of clarity (and/or conciseness) is so great that a meaningful search of the entire content of the claims is impossible. Therefore, the search has been restricted to the parts of the claims which are sufficiently supported and disclosed and are clear (and/or concise), that is the compositions including a tyrosine kinase inhibitor as mentioned in claim 1, alone or in combination with a dendritic cell growth factor, and the use of said compositions for treating tumours.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. In the event of the application being pursued in the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search could be carried out during the examination procedure before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), with the proviso that the problems that led to the statement under PCT Article 17(2) are resolved.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/02744

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0210339	A	07-02-2002	AU 9052301 A EP 1307539 A2 WO 0210339 A2 US 2003191048 A1	13-02-2002 07-05-2003 07-02-2002 09-10-2003
WO 9411392	A	26-05-1994	AU 5548694 A MX 9306930 A1 WO 9411392 A1	08-06-1994 31-08-1994 26-05-1994
WO 0245717	A	13-06-2002	AU 3517502 A WO 0245717 A1 US 2002156023 A1	18-06-2002 13-06-2002 24-10-2002
WO 0234727	A	02-05-2002	AU 1826202 A BR 0114870 A CA 2424470 A1 CZ 20031152 A3 WO 0234727 A2 EP 1332137 A2 HU 0301512 A2 JP 2004512328 T NO 20031833 A SK 5182003 A3 US 2004023976 A1	06-05-2002 17-02-2004 02-05-2002 14-04-2004 02-05-2002 06-08-2003 28-11-2003 22-04-2004 24-04-2003 03-02-2004 05-02-2004
WO 0145689	A	28-06-2001	AU 3436301 A CA 2395461 A1 EP 1255536 A2 JP 2004500363 T WO 0145689 A2 US 2004002534 A1 US 2002010203 A1	03-07-2001 28-06-2001 13-11-2002 08-01-2004 28-06-2001 01-01-2004 24-01-2002
WO 03002109	A	09-01-2003	CA 2452200 A1 CA 2452361 A1 CA 2452392 A1 EP 1401416 A2 WO 03003004 A2 WO 03002109 A2 WO 03004007 A2 US 2003091974 A1 CA 2452169 A1 EP 1401415 A2 WO 03002108 A2 CA 2452167 A1 EP 1401414 A2 WO 03002107 A2	09-01-2003 09-01-2003 16-01-2003 31-03-2004 09-01-2003 09-01-2003 16-01-2003 15-05-2003 09-01-2003 31-03-2004 09-01-2003 09-01-2003 31-03-2004 09-01-2003
DE 19813760	A	07-10-1999	DE 19813760 A1 CA 2325735 A1 WO 9949881 A2 EP 1066050 A2 JP 2002509892 T	07-10-1999 07-10-1999 07-10-1999 10-01-2001 02-04-2002
US 5348739	A	20-09-1994	US 6245563 B1 US 6063373 A AT 136786 T AU 640954 B2	12-06-2001 16-05-2000 15-05-1996 09-09-1993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/02744

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5348739	A	AU 6419190 A	18-04-1991
		CA 2066728 A1	20-03-1991
		DE 69026620 D1	23-05-1996
		DE 69026620 T2	02-10-1996
		DK 493468 T3	26-08-1996
		EP 0493468 A1	08-07-1992
		ES 2087163 T3	16-07-1996
		JP 2845622 B2	13-01-1999
		JP 5504548 T	15-07-1993
		KR 195392 B1	15-06-1999
		NO 921050 A	18-03-1992
		WO 9104037 A1	04-04-1991

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/02744

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K31/506 A61P11/06 A61P35/00 A61P31/12 A61P29/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 02/10339 A (OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVER ; ORTHO MCNEIL PHARM INC (US)) 7 février 2002 (2002-02-07) page 1, ligne 10-13 page 9, ligne 10-21 page 50, ligne 1 - page 51, ligne 3 revendications 1,2,12	1,3-5,7, 10,11
X	WO 94/11392 A (WARNER LAMBERT CO) 26 mai 1994 (1994-05-26) page 1, ligne 10 page 5, ligne 2-5 revendications 1,15,16	1,2
X	WO 02/45717 A (TULARIK INC) 13 juin 2002 (2002-06-13) revendications 1,5,6,8-11	1-5,7, 10,11
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 février 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24.05.04

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Veronese, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02744

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents clés, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 02/34727 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ; NOVARTIS AG (CH); BUCHDUNGER ELISABE) 2 mai 2002 (2002-05-02). page 3, alinéa 2; revendications revendications 1,2 page 2, alinéa 2-4	1,3-5
X	WO 01/45689 A (SUGEN INC ; LIPSON KEN (US); MCMAHON GERALD (US)) 28 juin 2001 (2001-06-28) page 4, ligne 16,17 page 27, ligne 1,27 page 28, ligne 23 page 29, ligne 22 page 31, ligne 22 revendications 1,3-5	1-3
X	PENG D ET AL: "TRIPLE COMBINATION WITH STI571 (GLEEVEC), TRASTUZUMAB (HERCEPTIN) AND CETUXIMAB (IMC-C225): A TREATMENT MODEL FOR BREAST CANCER THROUGH MODULATION OF GROWTH FACTOR RECEPTORS AND TYROSINE KINASES SIGNALING" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 43, mars 2002 (2002-03), page 846, XP001147889 ISSN: 0197-016X abrégé	11
E	WO 03/002109 A (MOUSSY ALAIN ; SCIENCE AB (FR); KINET JEAN-PIERRE (US)) 9 janvier 2003 (2003-01-09) page 1, ligne 1-10 page 8, ligne 15-20; revendications 1,39,40	1,2,7,11
A	"FDA APPROVES GLEEVEC FOR LEUKEMIA TREATMENT" FDA CONSUMER, US DEPT. OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, PUBLIC HEALTH SERVI, US, vol. 4, juillet 2001 (2001-07), page 6. XP001145627 ISSN: 0362-1332 abrégé	1

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02744

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	"Gleevec therapy in c-KIT negative soft tissue sarcomas: a molecular rationale" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 38, novembre 2002 (2002-11), page S56, XP004403617 ISSN: 0959-8049 abrégé	1,2
Y	DE 198 13 760 A (MULTHOFF GABRIELE) 7 octobre 1999 (1999-10-07) le document en entier	7,8, 10-12
Y	US 5 348 739 A (HERMODSSON SVANTE H ET AL) 20 septembre 1994 (1994-09-20) le document en entier	7,8, 10-12

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: revendications: 3-12 (partiellement), 1
(complètement)

Utilisation d' un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit, et ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF, (seul ou mélangée avec en outre agent potentialisant), pour la préparation d' une composition pour le traitement préventif ou curatif des tumeurs NK sensibles non liées à une mutation constitutive dans une tyrosine kinase.

2. revendications: revendications: 3-12 (partiellement), 2
(complètement)

Utilisation d' un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit, et ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF, (seul ou mélangée avec un outre agent potentialisant), pour la préparation d' une composition pour le traitement préventif ou curatif des maladies inflammatoires.

3. revendications: revendications: 13-14 (complètement)

Composition comprenant des cellules dendritiques traités par un inhibiteur des tyrosine kinases c-abl, bcr/abl, c-kit, et ou de la tyrosine kinase associée au récepteur du PDGF.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 03/02744

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°s
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n°s
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour
qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir FEUILLE ANNEXÉE PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n°s
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la
troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est
3-12 (partiellement), 1 (complètement)

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: -

La définition "agent potentialisant" et la définition "tumeurs NK sensibles non liée à une mutation constitutive dans une tyrosine kinase" ne sont pas claires et ont trait à une très grande variété de compositions. En fait, les revendications contiennent tant d'options, de variables, de permutations possibles et de conditions que le manque de clarté (et/ou de concision) qui s'en suit est d'une importance telle qu'une recherche significative de l'objet des revendications devient impossible. Par conséquent, la recherche a été effectuée pour les parties de la demande qui apparaissent être claires (et/ou concises), c'est à dire les compositions comprenant un inhibiteur des tyrosine kinases mentionné dans la revendication 1, seul ou combiné à un facteur de croissance des cellules dendritiques, et l'utilisation de ces compositions pour le traitement des tumeurs.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II. Si la demande devait être poursuivie dans la phase régionale devant l'OEB, il est rappelé au déposant qu'une recherche pourrait être effectuée durant la procédure d'examen devant l'OEB (voir Directive OEB C-VI, 8.5) à condition que les problèmes ayant conduit à la déclaration conformément à l'Article 17(2) PCT aient été résolus.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/02744

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0210339	A	07-02-2002	AU 9052301 A EP 1307539 A2 WO 0210339 A2 US 2003191048 A1	13-02-2002 07-05-2003 07-02-2002 09-10-2003
WO 9411392	A	26-05-1994	AU 5548694 A MX 9306930 A1 WO 9411392 A1	08-06-1994 31-08-1994 26-05-1994
WO 0245717	A	13-06-2002	AU 3517502 A WO 0245717 A1 US 2002156023 A1	18-06-2002 13-06-2002 24-10-2002
WO 0234727	A	02-05-2002	AU 1826202 A BR 0114870 A CA 2424470 A1 CZ 20031152 A3 WO 0234727 A2 EP 1332137 A2 HU 0301512 A2 JP 2004512328 T NO 20031833 A SK 5182003 A3 US 2004023976 A1	06-05-2002 17-02-2004 02-05-2002 14-04-2004 02-05-2002 06-08-2003 28-11-2003 22-04-2004 24-04-2003 03-02-2004 05-02-2004
WO 0145689	A	28-06-2001	AU 3436301 A CA 2395461 A1 EP 1255536 A2 JP 2004500363 T WO 0145689 A2 US 2004002534 A1 US 2002010203 A1	03-07-2001 28-06-2001 13-11-2002 08-01-2004 28-06-2001 01-01-2004 24-01-2002
WO 03002109	A	09-01-2003	CA 2452200 A1 CA 2452361 A1 CA 2452392 A1 EP 1401416 A2 WO 03003004 A2 WO 03002109 A2 WO 03004007 A2 US 2003091974 A1 CA 2452169 A1 EP 1401415 A2 WO 03002108 A2 CA 2452167 A1 EP 1401414 A2 WO 03002107 A2	09-01-2003 09-01-2003 16-01-2003 31-03-2004 09-01-2003 09-01-2003 16-01-2003 15-05-2003 09-01-2003 31-03-2004 09-01-2003 09-01-2003 31-03-2004 09-01-2003
DE 19813760	A	07-10-1999	DE 19813760 A1 CA 2325735 A1 WO 9949881 A2 EP 1066050 A2 JP 2002509892 T	07-10-1999 07-10-1999 07-10-1999 10-01-2001 02-04-2002
US 5348739	A	20-09-1994	US 6245563 B1 US 6063373 A AT 136786 T AU 640954 B2	12-06-2001 16-05-2000 15-05-1996 09-09-1993

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 03/02744

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5348739 A		AU 6419190 A	18-04-1991
		CA 2066728 A1	20-03-1991
		DE 69026620 D1	23-05-1996
		DE 69026620 T2	02-10-1996
		DK 493468 T3	26-08-1996
		EP 0493468 A1	08-07-1992
		ES 2087163 T3	16-07-1996
		JP 2845622 B2	13-01-1999
		JP 5504548 T	15-07-1993
		KR 195392 B1	15-06-1999
		NO 921050 A	18-03-1992
		WO 9104037 A1	04-04-1991